O Fortalecimento Intensivo das Ciências Biológicas e suas Interfaces 2

Daniela Reis Joaquim de Freitas
(Organizadora)

Atena Editora
Ano 2021

O Fortalecimento Intensivo das Ciências Biológicas e suas Interfaces 2

Daniela Reis Joaquim de Freitas
(Organizadora)

Atena Editora
Ano 2021

Editora Chefe
Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira
Assistentes Editoriais
Natalia Oliveira
Bruno Oliveira
Flávia Roberta Barão
Bibliotecária
Janaina Ramos
Projeto Gráfico e Diagramação
Natália Sandrini de Azevedo
Camila Alves de Cremo
Luiza Alves Batista
Maria Alice Pinheiro
Imagens da Capa
Shutterstock
Edição de Arte
Luiza Alves Batista
Revisão
Os Autores

2021 *by Atena Editora*
Copyright © Atena Editora
Copyright do Texto © 2021 Os autores
Copyright da Edição © 2021 Atena Editora
Direitos para esta edição cedidos à Atena Editora pelos autores.

Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição *Creative Commons*. Atribuição-Não-Comercial-NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. Permitido o *download* da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

Conselho Editorial
Ciências Humanas e Sociais Aplicadas
Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná
Prof. Dr. Américo Junior Nunes da Silva – Universidade do Estado da Bahia
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília

Atena Editora
Ano 2021

Prof. Dr. Carlos Antonio de Souza Moraes – Universidade Federal Fluminense
Prof. Dr. Crisóstomo Lima do Nascimento – Universidade Federal Fluminense
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Daniel Richard Sant'Ana – Universidade de Brasília
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia
Profª Drª Dilma Antunes Silva – Universidade Federal de São Paulo
Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Farias – Universidade Estácio de Sá
Prof. Dr. Elson Ferreira Costa – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Eloi Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima
Prof. Dr. Gustavo Henrique Cepolini Ferreira – Universidade Estadual de Montes Claros
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Prof. Dr. Jadson Correia de Oliveira – Universidade Católica do Salvador
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Prof. Dr. Luis Ricardo Fernandes da Costa – Universidade Estadual de Montes Claros
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Pontifícia Universidade Católica de Campinas
Profª Drª Maria Luzia da Silva Santana – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Pablo Ricardo de Lima Falcão – Universidade de Pernambuco
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador
Prof. Dr. Saulo Cerqueira de Aguiar Soares – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Vanessa Ribeiro Simon Cavalcanti – Universidade Católica do Salvador
Prof. Dr. William Cleber Domingues Silva – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar
Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano
Prof. Dr. Arinaldo Pereira da Silva – Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará
Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Profª Drª Carla Cristina Bauermann Brasil – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Cleberton Correia Santos – Universidade Federal da Grande Dourados
Profª Drª Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia
Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Fágner Cavalcante Patrocínio dos Santos – Universidade Federal do Ceará
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Jael Soares Batista – Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Prof. Dr. Jayme Augusto Peres – Universidade Estadual do Centro-Oeste
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Profª Drª Lina Raquel Santos Araújo – Universidade Estadual do Ceará
Prof. Dr. Pedro Manuel Villa – Universidade Federal de Viçosa
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Profª Drª Talita de Santos Matos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Tiago da Silva Teófilo – Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Atena Editora
Ano 2021

Ciências Biológicas e da Saúde
Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília
Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
Profª Drª Daniela Reis Joaquim de Freitas – Universidade Federal do Piauí
Profª Drª Débora Luana Ribeiro Pessoa – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Profª Drª Elizabeth Cordeiro Fernandes – Faculdade Integrada Medicina
Profª Drª Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Profª Drª Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Fernanda Miguel de Andrade – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Dr. Fernando Mendes – Instituto Politécnico de Coimbra – Escola Superior de Saúde de Coimbra
Profª Drª Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Helio Franklin Rodrigues de Almeida – Universidade Federal de Rondônia
Profª Drª Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Jefferson Thiago Souza – Universidade Estadual do Ceará
Prof. Dr. Jesus Rodrigues Lemos – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Jônatas de França Barros – Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof. Dr. Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Maria Tatiane Gonçalves Sá – Universidade do Estado do Pará
Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federacl do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá
Prof. Dr. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados
Profª Drª Regiane Luz Carvalho – Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino
Profª Drª Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Welma Emidio da Silva – Universidade Federal Rural de Pernambuco

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias
Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto
Profª Drª Ana Grasielle Dionísio Corrêa – Universidade Presbiteriana Mackenzie
Prof. Dr. Carlos Eduardo Sanches de Andrade – Universidade Federal de Goiás
Profª Drª Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Cleiseano Emanuel da Silva Paniagua – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás
Prof. Dr. Douglas Gonçalves da Silva – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Profª Drª Érica de Melo Azevedo – Instituto Federal do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Profª Dra. Jéssica Verger Nardeli – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande

Atena Editora
Ano 2021

Profª Drª Luciana do Nascimento Mendes – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Marcelo Marques – Universidade Estadual de Maringá
Prof. Dr. Marco Aurélio Kistemann Junior – Universidade Federal de Juiz de Fora
Profª Drª Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Priscila Tessmer Scaglioni – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Sidney Gonçalo de Lima – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Linguística, Letras e Artes
Profª Drª Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Angeli Rose do Nascimento – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
Profª Drª Carolina Fernandes da Silva Mandaji – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Profª Drª Denise Rocha – Universidade Federal do Ceará
Profª Drª Edna Alencar da Silva Rivera – Instituto Federal de São Paulo
Profª DrªFernanda Tonelli – Instituto Federal de São Paulo,
Prof. Dr. Fabiano Tadeu Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Profª Drª Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná
Profª Drª Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará
Profª Drª Sandra Regina Gardacho Pietrobon – Universidade Estadual do Centro-Oeste
Profª Drª Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia

Conselho Técnico Científico
Prof. Me. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo
Prof. Me. Adalberto Zorzo – Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza
Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba
Prof. Dr. Adilson Tadeu Basquerote Silva – Universidade para o Desenvolvimento do Alto Vale do Itajaí
Profª Ma. Adriana Regina Vettorazzi Schmitt – Instituto Federal de Santa Catarina
Prof. Dr. Alex Luis dos Santos – Universidade Federal de Minas Gerais
Prof. Me. Alexsandro Teixeira Ribeiro – Centro Universitário Internacional
Profª Ma. Aline Ferreira Antunes – Universidade Federal de Goiás
Profª Drª Amanda Vasconcelos Guimarães – Universidade Federal de Lavras
Prof. Me. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão
Profª Ma. Andréa Cristina Marques de Araújo – Universidade Fernando Pessoa
Profª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico
Profª Drª Andrezza Miguel da Silva – Faculdade da Amazônia
Profª Ma. Anelisa Mota Gregoleti – Universidade Estadual de Maringá
Profª Ma. Anne Karynne da Silva Barbosa – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Antonio Hot Pereira de Faria – Polícia Militar de Minas Gerais
Prof. Me. Armando Dias Duarte – Universidade Federal de Pernambuco
Profª Ma. Bianca Camargo Martins – UniCesumar
Profª Ma. Carolina Shimomura Nanya – Universidade Federal de São Carlos
Prof. Me. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Me. Carlos Augusto Zilli – Instituto Federal de Santa Catarina
Prof. Me. Christopher Smith Bignardi Neves – Universidade Federal do Paraná
Profª Drª Cláudia de Araújo Marques – Faculdade de Música do Espírito Santo
Profª Drª Cláudia Taís Siqueira Cagliari – Centro Universitário Dinâmica das Cataratas
Prof. Me. Clécio Danilo Dias da Silva – Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Me. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará
Profª Ma. Daniela da Silva Rodrigues – Universidade de Brasília
Profª Ma. Daniela Remião de Macedo – Universidade de Lisboa

Profª Ma. Dayane de Melo Barros – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Me. Douglas Santos Mezacas – Universidade Estadual de Goiás
Prof. Me. Edevaldo de Castro Monteiro – Embrapa Agrobiologia
Prof. Me. Edson Ribeiro de Britto de Almeida Junior – Universidade Estadual de Maringá
Prof. Me. Eduardo Gomes de Oliveira – Faculdades Unificadas Doctum de Cataguases
Prof. Me. Eduardo Henrique Ferreira – Faculdade Pitágoras de Londrina
Prof. Dr. Edwaldo Costa – Marinha do Brasil
Prof. Me. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita
Prof. Me. Ernane Rosa Martins – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás
Prof. Me. Euvaldo de Sousa Costa Junior – Prefeitura Municipal de São João do Piauí
Prof. Dr. Everaldo dos Santos Mendes – Instituto Edith Theresa Hedwing Stein
Prof. Me. Ezequiel Martins Ferreira – Universidade Federal de Goiás
Profª Ma. Fabiana Coelho Couto Rocha Corrêa – Centro Universitário Estácio Juiz de Fora
Prof. Me. Fabiano Eloy Atílio Batista – Universidade Federal de Viçosa
Prof. Me. Felipe da Costa Negrão – Universidade Federal do Amazonas
Prof. Me. Francisco Odécio Sales – Instituto Federal do Ceará
Prof. Me. Francisco Sérgio Lopes Vasconcelos Filho – Universidade Federal do Cariri
Profª Drª Germana Ponce de Leon Ramírez – Centro Universitário Adventista de São Paulo
Prof. Me. Gevair Campos – Instituto Mineiro de Agropecuária
Prof. Me. Givanildo de Oliveira Santos – Secretaria da Educação de Goiás
Prof. Dr. Guilherme Renato Gomes – Universidade Norte do Paraná
Prof. Me. Gustavo Krahl – Universidade do Oeste de Santa Catarina
Prof. Me. Helton Rangel Coutinho Junior – Tribunal de Justiça do Estado do Rio de Janeiro
Profª Ma. Isabelle Cerqueira Sousa – Universidade de Fortaleza
Profª Ma. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia
Prof. Me. Javier Antonio Albornoz – University of Miami and Miami Dade College
Prof. Me. Jhonatan da Silva Lima – Universidade Federal do Pará
Prof. Dr. José Carlos da Silva Mendes – Instituto de Psicologia Cognitiva, Desenvolvimento Humano e Social
Prof. Me. Jose Elyton Batista dos Santos – Universidade Federal de Sergipe
Prof. Me. José Luiz Leonardo de Araujo Pimenta – Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria Uruguay
Prof. Me. José Messias Ribeiro Júnior – Instituto Federal de Educação Tecnológica de Pernambuco
Profª Drª Juliana Santana de Curcio – Universidade Federal de Goiás
Profª Ma. Juliana Thaisa Rodrigues Pacheco – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Kamilly Souza do Vale – Núcleo de Pesquisas Fenomenológicas/UFPA
Prof. Dr. Kárpio Márcio de Siqueira – Universidade do Estado da Bahia
Profª Drª Karina de Araújo Dias – Prefeitura Municipal de Florianópolis
Prof. Dr. Lázaro Castro Silva Nascimento – Laboratório de Fenomenologia & Subjetividade/UFPR
Prof. Me. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Ma. Lilian Coelho de Freitas – Instituto Federal do Pará
Profª Ma. Lilian de Souza – Faculdade de Tecnologia de Itu
Profª Ma. Liliani Aparecida Sereno Fontes de Medeiros – Consórcio CEDERJ
Profª Drª Lívia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás
Prof. Dr. Lucio Marques Vieira Souza – Secretaria de Estado da Educação, do Esporte e da Cultura de Sergipe
Prof. Dr. Luan Vinicius Bernardelli – Universidade Estadual do Paraná
Profª Ma. Luana Ferreira dos Santos – Universidade Estadual de Santa Cruz
Profª Ma. Luana Vieira Toledo – Universidade Federal de Viçosa
Prof. Me. Luis Henrique Almeida Castro – Universidade Federal da Grande Dourados
Prof. Me. Luiz Renato da Silva Rocha – Faculdade de Música do Espírito Santo
Profª Ma. Luma Sarai de Oliveira – Universidade Estadual de Campinas
Prof. Dr. Michel da Costa – Universidade Metropolitana de Santos

Prof. Me. Marcelo da Fonseca Ferreira da Silva – Governo do Estado do Espírito Santo
Prof. Dr. Marcelo Máximo Purificação – Fundação Integrada Municipal de Ensino Superior
Prof. Me. Marcos Aurelio Alves e Silva – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo
Profª Ma. Maria Elanny Damasceno Silva – Universidade Federal do Ceará
Profª Ma. Marileila Marques Toledo – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Prof. Dr. Pedro Henrique Abreu Moura – Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
Prof. Me. Pedro Panhoca da Silva – Universidade Presbiteriana Mackenzie
Profª Drª Poliana Arruda Fajardo – Universidade Federal de São Carlos
Prof. Me. Rafael Cunha Ferro – Universidade Anhembi Morumbi
Prof. Me. Ricardo Sérgio da Silva – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Me. Renan Monteiro do Nascimento – Universidade de Brasília
Prof. Me. Renato Faria da Gama – Instituto Gama – Medicina Personalizada e Integrativa
Profª Ma. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal
Prof. Me. Robson Lucas Soares da Silva – Universidade Federal da Paraíba
Prof. Me. Sebastião André Barbosa Junior – Universidade Federal Rural de Pernambuco
Profª Ma. Silene Ribeiro Miranda Barbosa – Consultoria Brasileira de Ensino, Pesquisa e Extensão
Profª Ma. Solange Aparecida de Souza Monteiro – Instituto Federal de São Paulo
Profª Ma. Taiane Aparecida Ribeiro Nepomoceno – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Prof. Me. Tallys Newton Fernandes de Matos – Faculdade Regional Jaguaribana
Profª Ma. Thatianny Jasmine Castro Martins de Carvalho – Universidade Federal do Piauí
Prof. Me. Tiago Silvio Dedoné – Colégio ECEL Positivo
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

Ciências Biológicas e da Saúde

Atena
Editora
Ano 2021

O fortalecimento intensivo das ciências biológicas e suas interfaces 2

Bibliotecária: Janaina Ramos
Diagramação: Camila Alves de Cremo
Correção: Flávia Roberta Barão
Edição de Arte: Luiza Alves Batista
Revisão: Os Autores
Organizadora: Daniela Reis Joaquim de Freitas

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

F736 O fortalecimento intensivo das ciências biológicas e suas interfaces 2 / Organizadora Daniela Reis Joaquim de Freitas. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2021.

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia
ISBN 978-65-5983-135-7
DOI 10.22533/at.ed.357212805

1. Ciências biológicas. I. Freitas, Daniela Reis Joaquim de (Organizadora). II. Título.

CDD 570

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná – Brasil
Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

Atena Editora
Ano 2021

Ciências Biológicas e da Saúde

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa.

APRESENTAÇÃO

O livro “O Fortalecimento Intensivo das Ciências Biológicas e suas Interfaces 2” é uma obra cujo foco principal está na interrelação das diferentes áreas das Ciências Biológicas e em suas interfaces com outras áreas na produção de conhecimento. O presente volume abordará em seus vinte capítulos o conhecimento interdisciplinar que compõe a grande área de Ciências Biológicas através de artigos científicos originais, pesquisas, relatos de casos e/ou revisões.

Cada um dos estudos selecionados foi desenvolvido em reconhecidas instituições de ensino e pesquisa do país, e aborda as diferentes áreas da Biologia e áreas correlatas, que possuem interface com ela - Parasitologia, Microbiologia, Farmacologia, Zoologia, Botânica, Medicina, Educação em Saúde, Biologia Celular e Molecular, Genética entre outras. É necessário destacar que mais que nunca, biólogos têm estado presentes cada vez mais em áreas de pesquisa antes consideradas específicas de outras profissões. Esta interdisciplinaridade é extremamente importante, pois pesquisas com olhares de diferentes profissionais tendem a ter mais êxito e gerar melhores frutos. Por isto, trabalhos diversos são aqui discutidos com a proposta de ampliar o conhecimento científico e acadêmico, assim como abordar temas atuais e de interesse direto também da comunidade em geral.

Acreditamos que esta obra será importante para a difusão do conhecimento e da ciência e, assim como todas as demais obras da Atena Editora, esta também passará por julgamento de um corpo editorial formado por mestres e doutores. Esperemos que que você faça bom proveito!

Daniela Reis Joaquim de Freitas

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 ..... **1**

ANÁLISE DOS RISCOS DA AUTOMEDICAÇÃO E A PREVALÊNCIA DESSE HÁBITO ENTRE OS ACADÊMICOS DA FACULDADE UNICESUMAR CAMPUS PONTA GROSSA

Ryan da Silva do Prado

DOI 10.22533/at.ed.3572128051

CAPÍTULO 2 ..... **17**

ANÁLISE COMPARATIVA DAS FIBRAS COLÁGENAS E DAS FIBRAS ELÁSTICAS DE CORONÁRIAS E CARÓTIDAS EM PACIENTES AUTOPSIADOS

Luciano Alves Matias da Silveira
Gabriela Ribeiro Juliano
Laura Sanches Aguiar
Guilherme Ribeiro Juliano
Bianca Gonçalves Silva Torquato
Mariana Silva Oliveira
Fernando Pimenta de Paula
Marina Guerra Rotelli
Isadora Ignácio Lourenço
Vicente de Paula Antunes Teixeira
Mara Lúcia da Fonseca Ferraz

DOI 10.22533/at.ed.3572128052

CAPÍTULO 3 ..... **43**

AVALIAÇÃO DA DISTÂNCIA GENÉTICA ENTRE POPULAÇÕES DE *Bursaphelenchus cocophilus*

Arinaldo Pereira da Silva
Josineide Rodrigues da Costa

DOI 10.22533/at.ed.3572128053

CAPÍTULO 4 ..... **49**

AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA CICATRIZAÇÃO DE PELE DE RATOS WISTAR TRATADOS COM POMADA DE EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE PERESKIA ACULEATA MILLER (ORA – PRO- NÓBIS)

Ana Rosa Crisci
Cauê Aparecido de Jesus Cavé Lima
Rosilene Alves Rodrigues
Vanessa Digilio Vanzo
Jose Norberto Bazon
Wilson Roberto Malfará
Lucila Costa Zini Angelotti

DOI 10.22533/at.ed.3572128054

CAPÍTULO 5 ..... **62**

ASPECTOS BIOLÓGICOS DA VIOLÊNCIA OBSTÉTRICA

Monique Rafaela de Oliveira Silva Lopes

Kátia Zeny Assumpção Pedroso
DOI 10.22533/at.ed.3572128055

CAPÍTULO 6 79

Baccharis milleflora (LESS.) D.C.: EFEITOS CONTRA FUNGOS OPORTUNISTAS E FATOR DE VIRULÊNCIA
Ana Lays Braga
Rafael Pereira da Cruz
Joara Nályda Pereira Carneiro
Antonia Thassya Lucas dos Santos
Débora Lima Sales
Victor Juno Alencar Fonseca
Luciene Ferreira de Lima
Henrique Douglas Melo Coutinho
Luiz Everson da Silva
Maria Flaviana Bezerra Morais-Braga
Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues
DOI 10.22533/at.ed.3572128056

CAPÍTULO 7 94

CONTAMINAÇÃO NO CULTIVO CELULAR: BOAS PRÁTICAS NO LABORATÓRIO
Giulia Galani Martha
Susane Lopes
Marcelo Maraschin
DOI 10.22533/at.ed.3572128057

CAPÍTULO 8 108

LA VACUNA RECOMBINANTE EG95 EN HOSPEDEROS INTERMEDIARIOS
EL LARGO CAMINO RECORRIDO EN LA BÚSQUEDA DE UNA VACUNA, PARA PREVENIR HIDATIDOSIS. DESDE LA INVESTIGACIÓN HASTA SU APLICACIÓN EN PROGRAMAS DE CONTROL. (1927 - 2016)
Jensen Oscar
Gertiser María Laura
DOI 10.22533/at.ed.3572128058

CAPÍTULO 9 134

DISPONIBILIDADE DE INFORMAÇÃO ORNITOLÓGICA DAS UNIDADES DE CONSERVAÇÃO DO ESTADO DO PARANÁ: PLANOS DE MANEJO
Adriana Barbosa Bussler
Vagner Cavarzere
DOI 10.22533/at.ed.3572128059

CAPÍTULO 10 147

ESTUDO DO FUNGO *Rhizopus stolonifer* CONHECIDO COMO BOLOR PRETO DO PÃO
Laryany Farias Vieira Fontenele
Aliny Lima de Sousa
Luana de Mikelle Rodrigues Pereira
DOI 10.22533/at.ed.35721280510

CAPÍTULO 11 ..... **155**

O PROFESSOR "IDEAL" NA VISÃO DE ALUNOS DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA: UM ESTUDO DESCRITIVO

Edla Helena Salles de Brito
Débora Rosana Alves Braga
Dulce Maria de Lucena Aguiar
Maria Elisa Machado Ferreira Marcelo
Maria Vieria de Lima Saintrain

DOI 10.22533/at.ed.35721280511

CAPÍTULO 12 ..... **163**

NODULAÇÃO EM FEIJÃO GUANDU (*Cajanus cajan* L.) EM RESPOSTA À APLICAÇÃO DE EXTRATO DE NÓDULOS

Simone Yasuda Fernandes
Glaucia Almeida de Morais
Lucas Ortega Martins
Adriana da Silva Ribeiro
Vinicius Nunes Gomes
Daniela Fialho Duarte
Débora de Araújo

DOI 10.22533/at.ed.35721280512

CAPÍTULO 13 ..... **175**

OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA A EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO EM *Physalis* L.

André Pinto Lima
Hortência Kardec da Silva
Rafael Cruz Cordeiro
Maryelle Vanilla de Abreu Cerqueira
Jéssica Barros Andrade
Aparecida Gomes Feitosa
Joseane Inácio da Silva Moraes

DOI 10.22533/at.ed.35721280513

CAPÍTULO 14 ..... **183**

PERSPECTIVAS DEL TRATAMIENTO MÉDICO DE LA ECHINOCOCCOSIS QUÍSTICA. GENERACIÓN DE EVIDENCIA CLÍNICA EN SU UTILIZACIÓN PRE Y POST QUIRÚRGICA

Walner Daniel da Rosa Alvarez
Marcela Risso
Carlos Russi
Elisa Figueredo
Ana María Acuña

DOI 10.22533/at.ed.35721280514

CAPÍTULO 15 ..... **194**

PARÂMETROS FISÍCOS-QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS PARA ANÁLISE DE

ÁGUA POTÁVEL
Junior Rodoi da Silva
Victor Abdiel de Souza de Brito
Arielly Neri de Oliveira
DOI 10.22533/at.ed.35721280515

CAPÍTULO 16.....203

PROJETO DE EXTENSÃO CIENTISTA NA ESCOLA: UM RELATO DE EXPERIÊNCIA
Tatiane do Nascimento Lima
Edihanne Gamarra Arguelho
Rogério Rodrigues Faria
DOI 10.22533/at.ed.35721280516

CAPÍTULO 17.....214

REPROGRAMAÇÕES METABÓLICAS EM MELANOMAS RESISTENTES AO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO
Camila Kehl Dias
Ivi Juliana Bristot
Fábio Klamt
DOI 10.22533/at.ed.35721280517

CAPÍTULO 18.....229

RECURSOS AROMÁTICOS DA AMAZÔNIA: OBTENÇÃO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E APLICAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS
Edilene Carvalho Gomes Ribeiro
Denise Fernandes Coutinho
DOI 10.22533/at.ed.35721280518

CAPÍTULO 19.....245

TECNOLOGIA DO DNA: CLONAGEM DE DNA EM CÉLULAS VIVAS E PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE
Claudio Fernando Graciano Martins
DOI 10.22533/at.ed.35721280519

CAPÍTULO 20.....255

TESTES DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA ADAPTADOS PARA ÓLEOS ESSENCIAIS
Cristiane Mengue Feniman Moritz
Carolina Melchior Pereira
Nathália Righi Pessôa da Silva
Larissa Franciscatti Hoffmann
Adryelen Cassiano Martins
Giovanna Maísa Macanhan
Milene Ribeiro da Silva
Daniella Londero Silva Batisti
Lidaiane Mariáh Silva dos Santos Franciscato
DOI 10.22533/at.ed.35721280520

SOBRE A ORGANIZADORA.....268

ÍNDICE REMISSIVO.....269

CAPÍTULO 1

ANÁLISE DOS RISCOS DA AUTOMEDICAÇÃO E A PREVALÊNCIA DESSE HÁBITO ENTRE OS ACADÊMICOS DA FACULDADE UNICESUMAR CAMPUS PONTA GROSSA

Data de aceite: 26/05/2021
Data de submissão: 09/03/2021

Ryan da Silva do Prado
Centro de Ensino Superior de Maringá (Unicesumar)
Ponta Grossa – Paraná
http://lattes.cnpq.br/4014785046959611

RESUMO: Uma prática muito comum entre as pessoas é sobre o consumo de medicamento e/ou substâncias para o tratamento de alguma profilaxia ou buscando certo benefício para o organismo, e em tal ação geralmente o indivíduo escolhe qual o melhor fármaco para melhor atender suas expectativas. Apesar dos muitos benefícios que tal ação pode acarretar ao consumidor, existem possíveis riscos que a automedicação pode apresentar, como efeitos colaterais indesejados ou ainda dependência química, e tendo isso como base que o presente projeto se desenvolve. Sendo assim, foi realizado uma pesquisa do tipo quantitativa a fim de analisar o quão prevalente é o consumo de certos fármacos sem o aval médico entre os acadêmicos da Faculdade Unicesumar Ponta Grossa, a partir de então foi realizado uma pesquisa bibliográfica sobre a composição e mecanismo de ação dos fármacos mais utilizados na classe dos analgésicos, anticoncepcionais femininos, anti-histamínicos, anti-inflamatórios e nootrópicos. visando obter uma maior compreensão acerca dos possíveis efeitos colaterais dos medicamentos devido ao uso não racional e dos riscos da automedicação.

PALAVRAS-CHAVE: Fármacos; pesquisa bibliográfica; prescrição médica; uso não racional.

ANALYSIS OF THE RISKS OF SELF-MEDICATION AND THE PREVALENCE OF THIS HABIT AMONG THE ACADEMICS OF UNICESUMAR COLLEGE CAMPUS PONTA GROSSA

ABSTRACT: A very common practice among people is about the consumption of medicine and/or substances for the treatment of some prophylaxis or seeking a certain benefit for the organism, and in such action usually the individual chooses the best drug to better supply their expectations. Despite the many benefits that such action may bring to the consumer, there are possible risks that self-medication may present, as unwanted side effects or even chemical dependence, and based on this project develops. Therefore, a quantitative research was carried out in order to analyze how prevalent the consumption of certain drugs is without the medical endorsement among the academics of Unicesumar College Ponta Grossa, from then on a bibliographic research was carried out on the composition and mechanism of action of the most used drugs in the class of analgesics, female contraceptives, antihistamines, anti-inflammatory drugs and nootropics. To gain a greater understanding of the possible side effects of the medicinal products due to non-rational use and the risks of self-medication.

KEYWORDS: Drugs; bibliographic research;

medical prescription; non-rational use.

1 I INTRODUÇÃO

A prática de automedicação como tratamento para doenças autolimitadas é muito comum entre a população (WHO, 2000). A automedicação é definida como o consumo de medicamentos sem prescrição médica com o objetivo de curar uma doença ou diminuir seus sintomas, muitas vezes sendo a escolha do medicamento partindo do próprio indivíduo ou até mesmo de terceiros, ao passo que nenhum desses tem a qualificação adequada para isso (MUSIAL et al., 2007).

É visível os benefícios que a automedicação pode trazer a população, como a rápida resolutividade de problemas de saúde menores sem a necessidade de atendimento médico, maior autonomia de escolha do tratamento, acesso direto e rápido, contribui até mesmo para a economia, tanto para o paciente ao qual evitará consultas médicas (quando se trata de um convênio) quanto para a própria rede de saúde que irá poupar recursos (WHO, 2000). Mas apesar de todos esses benefícios, muitas vezes não se observa os malefícios resultantes dessa prática, considerando que muitas pessoas não têm um conhecimento tão específico sobre a indicação dos medicamentos

Os medicamentos agem pela ação de uma ou mais substâncias ativas com propriedades terapêuticas, e por conta disso recebem normas rígidas que vão desde a sua produção até o consumo, e o seu uso sem o aval médico pode desencadear reações indesejáveis no organismo, ainda mais quando feito em excesso (TOMASINI et al., 2015). Alguns dos riscos comuns, mesmo que raros, sobre a automedicação se relaciona ao diagnóstico incorreto, reações adversas, intoxicações, resistência bacteriológica, mascaramento de uma doença mais grave, ou até mesmo indução a dependência química (WHO, 2000; GIL *et al*, 2019).

2 I MATERIAIS E METODOLOGIA

Tal projeto se desenvolveu a partir da aplicação de um questionário que foi disponibilizado aos acadêmicos da Faculdade Unicesumar Ponta Grossa, composto por 15 perguntas com o objetivo de traçar um perfil relacionado ao hábito de automedicação dos entrevistados, sendo todas as questões com respostas na forma quantitativa. Ao todo foram obtidas 32 respostas por parte dos acadêmicos. Com os dados computados na pesquisa, foi realizado uma revisão literária acerca da composição e mecanismos de ação dos fármacos mais utilizados através da automedicação dos acadêmicos.

3 I RESULTADOS

Para a realização da pesquisa, foi elaborado um questionário com 15 questões aos quais foram enviadas para os acadêmicos da Faculdade Unicesumar – Campus Ponta Grossa para aplicação de forma voluntária ao qual foram obtidas 32 respostas.

Em relação as questões aplicadas, foram divididas em 3 seções para melhor analise dos resultados, sendo a primeira questões sobre o perfil pessoal dos entrevistados, a segunda seções sobre o conhecimento que tais acadêmicos possuem sobre fármacos e nootrópicos bem como a frequência de sua utilização, por fim na última seção os entrevistados são questionados sobre quais os medicamentos e substâncias utilizam com maior frequência e sem prescrição médica dentre as classes de remédios pré-determinadas que foram: analgésicos, anticoncepcionais femininos, anti-histamínicos, anti-inflamatórios e nootrópicos.

Considerando os 32 voluntários que responderam o questionário, primeiro item a ser analisado foi em relação ao qual curso entrevistado está matriculado sendo apresentado no Tabela 1, sendo 31 mulheres e 1 homem (Tabela 2) e 18 deles têm faixa etária entre 20 e 30 anos (Tabela 3) e finalizando a seção foi questionado se são portadores de alguma doença crônica, sendo a porcentagem apresentada no Tabela 4, sendo esse último importante para encontrar uma possível justificativa para a automedicação

Curso	Número de Acadêmicos	%
Biomedicina	19	59,4
Ciências Biológicas	2	6,3
Educação Física	1	3,1
Enfermagem	2	6,3
Engenharia de software	1	3,1
Estética e Cosmética	2	6,3
Farmácia	1	3,1
Nutrição	1	3,1
Psicologia	3	9,4
TOTAL	**32**	**100**

Tabela 1 – Número dos entrevistados por curso

Fonte: O autor (2020)

Gênero	Número de Acadêmicos	%
Feminino	31	96,9
Masculino	1	3,1
Prefiro não responder	0	0
TOTAL	**32**	**100**

Tabela 2 – Número dos entrevistados divididos por gênero

Fonte: O autor (2020)

Faixa etária	Número de Acadêmicos	%
Abaixo de 20 anos	12	37,5
Entre 20 e 30 anos	18	56,3
Entre 30 e 40 anos	1	3,1
Acima de 40 anos	1	3,1
TOTAL	**32**	**100**

Tabela 3 – Número de entrevistados de acordo com faixa etária

Fonte: O autor (2020)

Possui Doença Crônica	Número de Acadêmicos	%
Sim	10	31,3
Não	22	68,8
TOTAL	**32**	**100**

Tabela 4 – Número de entrevistados portadores de alguma doença crônica

Fonte: O autor (2020)

Diante de tudo isso, foi questionado aos entrevistados sobre quais os medicamentos de uso mais comum dentre uma classe de fármacos pré-determinadas, mesmo entre aqueles que não possuem doenças crônicas (Tabela 4) ou não são habituados a automedicação, tais dados estão representados na Tabela 5, onde observa-se que muitos costumam consumir mais de uma classe de remédios, e importante ressaltar que em muitos casos obteve-se a recomendação médica para o uso desses fármacos no início do tratamento e posteriormente só houve a continuidade de uso por conta própria, principalmente se tratando de analgésicos e anti-histamínicos.

Tipo de Medicamento	Número de Acadêmicos	%
Analgésicos	25	78,1
Anticoncepcionais Femininos	6	18,8
Anti-histamínicos	12	37,5
Anti-inflamatórios	15	46,9
Nenhum	2	6,3

Tabela 5 – Porcentagem do tipo de medicamentos mais utilizados sem prescrição médica

Fonte: O autor (2020)

Finalizando a parte de medicamentos, foi pedido exemplos de medicamento de uso mais geral dentre as quatro classes presentes na tabela 5, sendo tais exemplos também pré-determinados e todos os seus dados apresentados na tabela 6.

Como uma última parte do projeto, ainda foi perguntado aos acadêmicos sobre seu conhecimento e uso de nootrópicos, substâncias que estimulam a capacidade cognitiva e aumentando o foco de atenção. Quando perguntados acerca da função de tais substâncias, 40,6% disseram ter conhecimento dessa classe e suas funções e 59,4% nunca ouviram falar das mesmas. Como feito em relação aos fármacos, foi descrito algumas substâncias nootrópicas aos quais deviam assinalar quais que consomem comumente no dia a dia, sendo tais resultados observados na tabela 7.

Como últimas questões do formulário, dois pontos importantes foram trazidos ao projeto referente a consciência dos entrevistados sobre a automedicação como um possível risco para a saúde e a frequência com que realizam tal ato, sendo apresentados na tabela 9 e 10 respectivamente.

Em relação à verem a automedicação como algo prejudicial ao organismo quando realizado em excesso, podendo causar danos mínimos que sejam, 75% têm consciência disso e procura se cuidar em relação a isso, já 21,9% também tem consciência mas não dá a devida importância aos riscos, e 3,1% dos entrevistados não tinha conhecimento de tal informação. (Tabela 8)

Ao serem questionados sobre a frequência com que usam medicamentos sem prescrição médica, 62,5% responderam que “Poucas vezes, somente quando realmente necessário”, 31,3% disseram que “Faço isso sempre, é um hábito praticamente” e 6,3% “Nunca tomo remédios por conta, sempre procuro um médico antes” (Tabela 9)

Classe de Medicamentos	Medicamento	Número de acadêmicos	%
Analgésicos	Buscopam	15	46,9
	Dipirona	2	6,3
	Doralgina	2	6,3
	Dorflex	21	65,6
	Ibuprofeno	20	62,5
	Paracetamol	27	84,4
	Ponstan	1	3,1
	Torsilax	2	6,3
	Nenhum sem prescrição médica	2	6,3
Anticoncepcionais Femininos	Allestra 20	0	0
	Ciclo 21	1	3,1
	Diclin	1	3,1
	Gestinol 28	2	6,3
	Lumi	3	9,4
	Moliére	1	3,1
	Selene	1	3,1
	Yaz	1	3,1
	Não uso anticoncepcionais	1	3,1
	Sou homem, logo não se aplica	1	3,1
	Nenhum sem prescrição médica	22	68,8
Anti-histamínicos	Cetirizina	0	0
	Histamin	2	6,3
	Loratadina	21	65,6
	Prometazina	1	3,1
	Nenhum sem prescrição médica	17	53,1
Anti-inflamatórios	Ácido Acetilsalicílico	6	18,8
	Diclofenaco	17	53,1
	Naproxeno	3	9,4
	Nimesulina	2	6,3
	Piroxidan	3	9,4
	Nenhum sem prescrição médica	10	31,2

Tabela 6 – Exemplos de medicamentos mais utilizados entre os acadêmicos

Fonte: O autor (2020)

Nootrópico	Número de Acadêmicos	%
Cafeína	18	56,3
Clomipramina	1	3,1
Fluoxetina	8	25,0
Ginseng	1	3,1
Nicotina	6	18,8
Revoq	1	3,1
Vitaminas do Complexo B	3	9,4
Nenhum	8	25,0

Tabela 7 – Exemplos de nootrópicos mais utilizados entre os acadêmicos

Fonte: O autor (2020)

Conhecimento	Número de Acadêmicos	%
Tenho consciência e me cuido em relação a isso	24	75
Tenho consciência, mas mesmo assim não me cuido	7	21,9
Não tinha conhecimento de tal informação	1	3,1
TOTAL	**32**	**100**

Tabela 8 – Porcentagem de acadêmicos com conhecimento acerca dos riscos da automedicação

Fonte: O autor (2020)

Frequência de Automedicação	Número de Acadêmicos	%
Sempre faço isso	10	31,2
Poucas vezes	20	62,5
Nunca faço isso	2	6,3
TOTAL	**32**	**100**

Tabela 9 – Porcentagem de acadêmicos habituados a realizar a automedicação

Fonte: O autor (2020)

Tendo todos os dados acima coletados, esse projeto decorreu traçando um perfil e possíveis justificativas dos adeptos a automedicação, mesmo com os perigos que tal ato oferece e os dados ainda assim elevados presentes nas tabelas 8 e 9 desse artigo. Além disso foi realizada a análise dos três fármacos ou substâncias com maior percentual de consumo entre os acadêmicos da Faculdade Unicesumar - Ponta Grossa entre as classes apresentadas no questionário, estudando a composição e possíveis ações fisiológicas que podem desencadear no organismo humano.

4 | DISCUSSÃO

4.1 Analgésicos

Sempre é muito comum sentimos dores como estímulos para a proteção corporal, principalmente em relação a algumas pequenas feridas teciduais ou lesões internas leves para que estas não se tornem mais graves. Mas por conta desse mecanismo de defesa do organismo, algumas dores são bastante irritantes e algumas até nos impossibilitam de realizarmos nossas atividades cotidianas. Por isso na atualidade dispomos dos fármacos analgésicos, que têm por função o alívio de dores corporais e atuam interferindo em resposta dos neurônios sensoriais primários a estímulos sensoriais somáticos ou viscerais, transmissão da informação ao cérebro e resposta perceptual a um estímulo doloroso. (GOLAN *et al.*, 2014)

Com base nisso e nas respostas obtidas atrás do questionário aplicado, julga-se importante realizar a análise dos mecanismos de ação dos fármacos analgésicos, principalmente considerando o seu uso frequente e acessível, não só em relação aos entrevistados, mas pensando no uso de toda a sociedade.

4.1.1 Paracetamol

Muito comum o uso do paracetamol (N-acetil-p-aminofenol, ou APAF) para o alívio das dores corporais, principalmente dores de cabeça, sendo o analgésico de uso mais comum entre os acadêmicos entrevistados, onde 27 (84,4%) (Tabela 6) o tem como um hábito de consumo.

Em condições de consumo normal no organismo esse fármaco é conjugado no fígado formando dois metabólicos inativos, o glicuronídio de paracetamol e o sulfato de paracetamol. Porém uma parte do paracetamol ainda sofre uma hidroxilização pela ação de uma enzima P450 ou PHS onde dará origem a um N-acetil-p-benzoquinoneimina (NAPQI), esse último metabólico produzido, que por sinal pode apresentar alta toxicidade, poderá reagir com o grupo de sulfidrila da glutationa ou com o grupo sulfidrila. (GOLAN *et al.*, 2014; WHALEN *et al.*, 2016) Na Figura 1 é possível obter uma melhor visualização de todas essas reações ocorrentes.

Em dosagens normais e adequadas o NAPQI irá reagir com a glutationa que é produzida pelo próprio fígado e darão origem a uma substância não tóxica, mas caso haja excesso de seu consumo ocorrerá a reação com o grupo sulfidrila das proteínas hepáticas, por conta do esgotamento da glutationa, e isso produzirá uma substância tóxica capaz de atrofiar as células hepáticas. (WHALEN *et al.*, 2016)

Esse é um dos principais motivos pelos quais não é recomendável o consumo de paracetamol para pacientes com insuficiência hepática e como Golan *et al.* (2014) aponta em sua obra, é um dos principais motivos pelo qual o uso de paracetamol é restrito nos Estados

Unidos, visto a grande dificuldade em diagnosticar as causas de uma hepatoxicidade.

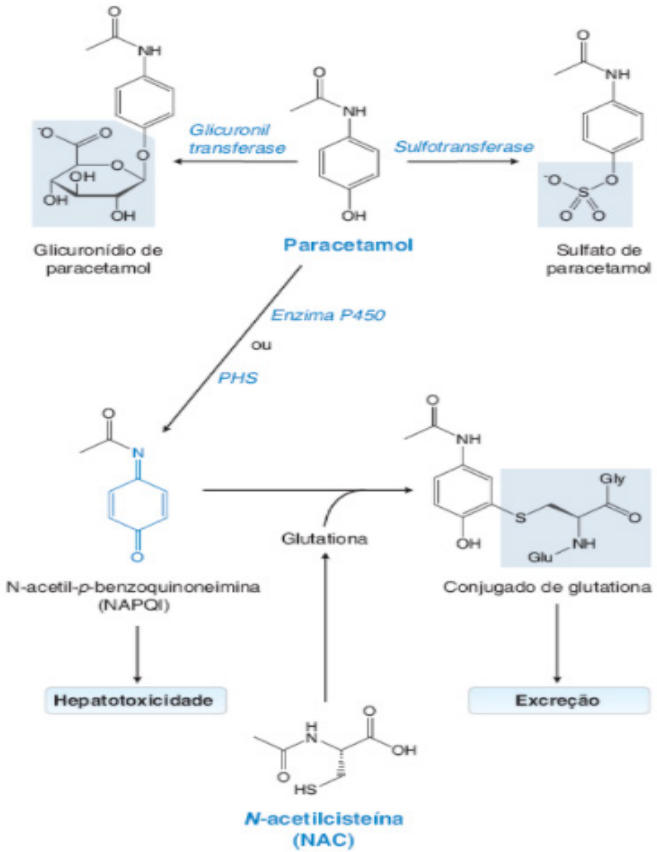


Figura 1 – Reações ocorridas a partir do paracetamol

Fonte: (GOLAN *et al.*, 2014)

4.1.2 Dorflex

Sendo um dos medicamentos mais comercializados no Brasil no ano de 2018 pelo quarto ano consecutivo segundo o Guia Interfarma de 2019, o Dorflex ao que tudo indica continua muito consumido pela população, sendo na pesquisa aqui realizada apontando que 21 dos 32 entrevistados (65,6%) consomem regularmente o fármaco, sendo seu uso exclusivo para dores musculares.

Segundo Barroso (2006), a orfenadrina, nome farmacêutico do Dorflex, é um agente espasmolítico que reduz a espasticidade diminuindo assim os reflexos tônicos e fraquezas musculares. Ainda aponta o fármaco como um agente anticolinérgico com ação predominante sobre o sistema motor extrapiramidal, e por conta disso é contraindicado para portadores de glaucoma, retenção urinária e miastenia gravis.

4.1.3 Ibuprofeno

Por fim, na classe dos analgésicos temos o Ibuprofeno, derivado do ácido propiônico e tendo as mesmas ações de aliviar dores como os anteriores e podendo atuar também como anti-inflamatório, são usados, principalmente, para combater dores de leves a moderadas originadas de distúrbios musculosqueléticos. (SEABRA, 2014; WHALEN *et al.*, 2016). Por conta dessa ação múltipla que também se encaixa em um dos fármacos mais comercializados, sendo comum entre 20 (62,5%) dos entrevistados nesse projeto.

Esse fármaco atua através da inibição da produção de prostaglandinas (PGs) segundo um mecanismo competitivo pelo local ativo da enzima cicloxigenase (COX). Essa enzima possui duas configurações muito semelhantes entre sim, sendo a COX-1 e a COX-2, que se diferem apenas pela quantidade de aminoácidos e localização desses na molécula. A ação analgésica do ibuprofeno se dá pela inibição principalmente da enzima $PGE_{2,}$ da mesma classe das protaglandinas, e tal inibição ocorre pela inibição da COX-2 que está presente nos locais de inflamação. Mas como toda substância em excesso pode desencadear muitos efeitos colaterais, todos causados pela inibição das duas enzimas citadas, entre eles: aumento da secreção de ácido gástrico causando sangramento gastrointestinais sendo esse um dos motivos para a recomendação do consumo junto com alimentos ou líquidos para amenizar desconfortos no trato gastrointestinal; retenção de água e sódio nos rins e consequentemente edemas renais; aumento do risco de eventos cardiovasculares causados pela baixa concentração de COX-2; entre outros. (WHALEN *et al.*, 2016) Por isso não é recomendável o consumo para pessoas com problemas renais, intestinais e cardiovasculares, e ainda para pacientes não acometidos de tais doenças, é importante seu consumo consciente e limitado, sempre na menor dose e pela menor duração possível.

4.2 Anticoncepcionais femininos

Tais substâncias atuam no ciclo menstrual da mulher, evitando que haja a fecundação de um embrião, ou ainda o processo de nidação do zigoto no útero. Tendo os mais diversos tipos de contraceptivos, os de uso mais comum entre as mulheres continua sendo as pílulas hormonais orais, esses métodos anticoncepcionais têm em sua composição uma configuração sintética dos hormônios já produzidos pela mulher naturalmente, o estrogênio e a progesterona, que quando absorvidos pelo organismo inibem a liberação dos hormônios Folículo Estimulante (FSH) e Hormônio Luteinizante (LH), que são os responsáveis pela maturação e liberação dos folículos uterinos que por sua vez desencadeiam a liberação do óvulo, uma vez que os hormônios não são liberados pela hipófise, não ocorre a maturação do óvulo para ser fecundado (SOUZA, 2015).

Os dois fármacos mais utilizados entre nossas acadêmicas, por coincidência, tratam-se ambos de pílulas combinadas a base de estrogênio e progesterona, que

se tratam de Gestinol 28 e Lumi, mas julga-se importante levantar aqui que 75% das mulheres não utilizam tais fármacos sem o acompanhamento médico, e 3,1% não utilizam anticoncepcionais; e também importante citar a mínima diferença percentual em relação a quantificação de consumo dos medicamentos, mostrando que cada organismo possui sua especificidade para se adaptar a medicamentos.

Em relação a composição dos fármacos, como citado acima, os dois possuem uma combinação de estrogênio e progesterona na forma sintética, sendo que o Gestinol 28 possui etinilestradiol (estrógeno) e gestodeno (progestina) enquanto que o Lumi possui etinilestradiol (estrogênio) e drospirenona (progesterona) (SOUZA, 2015), e uma das razões para o consumo de anticoncepcionais combinatórios se dá por os estrógenos sozinhos serem precursores do crescimento endometrial e que pode causar o câncer de endométrio, logo a presença da progestina limita esse crescimento (GOLAN *et al.*, 2014).

Além do risco de câncer, há outras contraindicações com pelo fato de aumentarem a probabilidade de AVC, Tromboembolismo Pulmonar e problemas cardíacos, e sintomas como alteração de humor, dor de cabeça e náusea são comuns entre as mulheres (SIQUEIRA *et al*, 2018).

4.3 Anti-histamínicos

Segundo Golen *et al* (2014) a histamina pode ser encontrada em diversos tecidos do corpo e tem por função aumentar ou diminuir a atividade de células adjacentes podendo se ligar com 4 diferentes receptores: H_1, H_2, H_3 e H_4, sendo os dois primeiros os mais comuns, e ainda destaca que a histamina é um importante mediador dos processos inflamatórios: desempenha também funções significativas na regulação da secreção de ácido gástrico e na neurotransmissão.

Embora apresente benefícios para o organismo, também traz certos efeitos colaterais decorrentes dessas ligações como os receptores H_1 medeiam vários processos patológicos, incluindo rinite alérgica, dermatite atópica, conjuntivite, urticária, broncoconstrição, asma e anafilaxia. A histamina ainda estimula as células parietais do estômago, causando aumento na secreção ácida pela ativação de receptores H_2 (WHALEN *et al.*, 2016).

Por essa razão são desenvolvidos agonistas inversos a histamina, aos quais terão a mesma função de se ligarem aos receptores na sua forma inativa e desviam o equilíbrio para o estado inativo, por conseguinte, mesmo na ausência de histamina endógena, os agonistas inversos reduzem a atividade constitutiva do receptor, e tais agonistas são por sua vez denominados anti-histamínicos (GOLAN *et al.*, 2014)

Apesar disso os anti-histamínicos, assim como qualquer outro fármaco, podem trazer efeitos indesejados ao organismo, principalmente se tratando dos fármacos da 1° geração dessa classe pois esses possuem baixa especificidade podendo se conectar com outros receptores que não os histamínicos (como muscarínicos colinérgicos, α-adrenérgicos e

serotoninérgicos), como é o caso do Histamin (ou Dexclorfeniramina) consumido por 6,3% dos acadêmicos, causando fadiga, tontura, falta de coordenação e tremores; eles também causam visão turva e retenção de urina. Já se tratando da 2° geração de anti-histamínicos como o Histadin (ou Loratadina) comum entre 65,6% dos acadêmicos entrevistados, possuem menos efeitos colaterais por possuírem maior especificidade com os receptores histamínicos, mas ainda são precursores principalmente de cefaleias (WHALEN *et al.*, 2016).

Outro efeito a ser citado por WHALEN *et al.* (2016) se refere a toxicidade desses medicamentos, onde sua superdosagem mesmo que rara é algo a ser debatido. Segundo o autor

> Embora a margem de segurança dos bloqueadores dos receptores H1 seja relativamente alta e a toxicidade crônica seja rara, o envenenamento agudo é relativamente comum, especialmente em crianças. Os efeitos mais comuns e perigosos do envenenamento agudo são os do SNC, incluindo alucinações, excitação, ataxia e convulsões. Se não for tratado, o paciente pode entrar em coma profundo e apresentar colapso cardiorrespiratório. (WHALEN ***et al.*** 2016; p. 397)

4.4 Anti-inflamatórios

Considerando que todos os fármacos dessa classe citado na pesquisa se classificam como Anti-inflamatórios não esteriodes (AINEs), possuem ações analgésicas, anti-inflamatórias e antipiréticas. Seus mecanismos de ação resultam na diminuição da síntese de prostaglandinas que podem causar efeitos indesejados ao organismo (WHALEN *et al.*, 2016). A seguir foi realizado uma pesquisa sobre a particularidade de cada um dos anti-inflamatórios mais consumidos pelos acadêmicos entrevistados.

4.4.1 Ácido Acetilsalicílico

Popularmente conhecida por Aspirina, o Ácido Acetilsalicílico é muito utilizado no tratamento de dores e inflamações, mas também pode ser útil na prevenção secundária de doenças cardiovasculares (SIMÃO, 2017). E se observa uma alta comercialização desse produto, visto sua acessibilidade e preço baixo, como aponta Schror (2009), sendo que 18,8% dos acadêmicos o utilizam no cotidiano.

Sua ação ocorre através da inibição de cicloxigenases (COXs), assim como a ação do Ibuprofeno citado anteriormente, onde o fármaco em questão atuará como um inibidor permanente das enzimas, ocasionando na acetilação covalente dos aminoácidos serina 530 (Ser-530) na COX-1 e serina 516 (Ser-516) na COX-2, impedindo por sua vez a ligação do ácido araquidônico que possui grande atividade inflamatória (SIMÃO, 2017)

Como aponta Katzung (2005) os principais efeitos colaterais do ácido acetilsalicílico em doses antitrombóticas consistem em desconforto gástrico (intolerância) e úlceras gástricas e duodenais. A hepatotoxicidade, a asma, os exantemas, o sangramento GI e

a toxicidade renal raramente ocorrem em doses antitrombóticas. Além disso seu uso é contraindicado para portadores de hemofilias devido a sua atividade antiplaquetária.

4.4.2 Diclofenaco

Sendo um derivado do ácido fenilacético, o diclofenaco é indicado para o tratamento de dor branda a moderada e inflamação no âmbito clínico e pós-operatório, além de amplamente utilizado no tratamento da dor associada a cálculos renais. (GELLER *et al*, 2012; GOLAN *et al,* 2014), e tendo um consumo muito usual entre as pessoas, sendo um hábito de consumo entre 53,1% dos entrevistados na pesquisa.

Embora pouco se saiba sobre seus mecanismos de ação exatos, basicamente utiliza-se da inibição das cicloxigenases que por sua vez inibe a via de ação do ácido araquidônico, além de suprimir a síntese de protoglandunas no hipotálamo, principalmente referente a PGE_2 (GELLER *et al*, 2012).

Por ter alta atividade no trato gastrointestinal (TGI), seus principais efeitos adversos estão relacionados com esse sistema, como diarreias, comprometimento do fluxo sanguíneo renal e a taxa de filtração glomerular e a elevação dos níveis séricos das aminotransferases, apontados por Katzung (2005).

4.5 Substâncias nootrópicas

As substâncias nootrópicas têm como principal finalidade o aumento do desempenho cognitivo no ser humano. Define-se como desempenho cognitivo a capacidade de atenção, memória, raciocínio, linguagem e compreensão. Apesar do principal alvo destas substâncias serem indivíduos com problemas cognitivos, nos últimos tempos tem-se registado um aumento da utilização destes fármacos por indivíduos saudáveis, sendo comum sua presença em fármacos especializados ou substâncias de consumo cotidiano (REQUETIM, 2013).

4.5.1 Cafeína

Sendo umas das substâncias de uso mais popular, não somente com os entrevistados onde 56,3% consomem, mas de consumo geral da sociedade, estando presente em diversos fármacos, ou podendo ser ingerida na forma de bebidas e até em alguns alimentos à base de cacau, ou seja, há vários meios que tornam a cafeína um dos compostos mais consumidos entre as pessoas, tendo como principal função a de estimulante.

Segundo Tavares & Sakata (2012), a cafeína possui cinco diferentes mecanismos de ação. O primeiro é através receptores de adenosina, onde a cafeína atua como inibindo os receptores de adenosina $A_{1,}$ A_{2a} e A_{2b} que consequentemente inibirá a ação de antinociceptivos; Outro mecanismo é inibindo a fosfodiesterase, potencializando assim a ação das catecolaminas como adrenalina, noradrenalina e dopamina; A terceira via de ação

ocorre por canais de cálcio, ativando esses que são sensíveis a rianodina e causando a liberação do cálcio intracelular; Por fim, o último mecanismo é a interação com receptores de $GABA_A$, bloqueando esses receptores. Todas essas vias de ação, causam no organismo muitos efeitos benéficos, onde Tavares & Sakata (2012) define como

A cafeína promove efeito antidepressivo, ansiolítico, neuro-protetor e melhora a função cognitiva 2. O bloqueio de receptores A2a pode ser de valor na prevenção de cirrose hepática. Em pessoas que não consomem café, a meia-vida da cafeína é duas vezes maior, o que explica a maior incidência de intoxicação nesse grupo

Apesar disso, a cafeína pode trazer alguns efeitos indesejáveis também decorrentes da dependência que seu consumo em excesso pode ocasionar, como por exemplo atraso da concepção, aumento da taxa de abortos espontâneos e redução do crescimento fetal; na população infantil e adolescente, pode causar cefaleia crônica diária e migrânia sem aura; em alguns indivíduos, a cafeína causa sono patológico porque produz sedação paradoxal e sua abstinência pode causar hipersônia; além de pode ocasionar ansiedade, crises de angústia, abstinência, dependência e alterações do sono (TAVARES & SAKATA, 2012)

4.5.2 Fluoxetina

A fluoxetina é indicada no tratamento da depressão maior, distúrbio obsessivo compulsivo, desordem pré-menstrual e bulimia nervosa (PRIETSCH, 2015), tendo um percentual de 25% o seu consumo entre os acadêmicos.

A fluoxetina é um inibidor da CYP450 2D6 e, portanto, pode inibir o metabolismo dos substratos da 2D6, como o propranolol e outros β-bloqueadores, antidepressivos tricíclicos, tramadol, opioides, como a metadona, codeína e oxicodona, antipsicóticos, como o haloperidol e a tioridazina, e muitos outros fármacos. Essa inibição do metabolismo pode resultar em níveis plasmáticos mais altos do fármaco administrado concomitantemente, levando a um aumento das reações adversas associadas ao fármaco, como síndrome serotoninérgica, caracterizada por diaforese, instabilidade autônoma, mioclonia, convulsões e coma (KATZUNG, 2005)

4.5.3 Nicotina

Composto ativo do tabaco, a nicotina é um dos únicos fármacos que não possui atividade terapêutica, sendo utilizado unicamente para estimulo do SNC juntamente com a cafeína, e tendo alta taxa de vicio entre os usuários (WHALEN *et al.*, 2016), e sendo contabilizado comum seu uso entre 18,8% dos entrevistados dessa pesquisa.

Como abordado por GOLAN *et al.* (2014), a nicotina se liga com receptores nicotínicos da acetilcolina centrais e periféricos, provocando grande dependência e ativando as vias de recompensa encefálica dopaminérgicos, podendo estimular atenção, o aprendizado, a resolução de problemas e o tempo de reação, isso como ações do SNC.

Nas atividades periféricas, a nicotina pode causar estimulação dos gânglios simpáticos, bem como da suprarrenal, aumenta a pressão arterial e a frequência cardíaca, sendo prejudicial para os hipertensos, também pode causar cólicas intestinais e diarreia. Além dos já conhecidos riscos principais, sendo um grave precursor para doenças pulmonares e cardiovasculares, vários cânceres e outras patologias. Sua dependência não é facilmente controlada (WHALEN *et al.*, 2016).

5 I CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com tudo o que foi apresentado nesse trabalho, observa-se a necessidade da discussão sobre efeitos colaterais que os fármacos podem apresentar, desde os mais simples e de uso habitual como analgésicos ou potenciais dependentes químicos como é o caso da nicotina. Cada fármaco aqui abordado possui seus efeitos adversos ocasionados por seu uso em excesso, e todos tem probabilidade, alta ou baixa, de causar dependência aos seus usuários.

REFERÊNCIAS

BARROSO, Antônio Botelho. **Avaliação do uso de Rheumazin, uma Associação do Piroxicam, Dexametaso, Cianocobalamina e Orfenadrina na Exodontia do Terceiro Molar**. 2006. 117 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmacologia Clínica, Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006. Disponível em: http://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/2207/1/2006_dis_abbarroso.pdf. Acesso em: 10 dez. 2020

GELLER, Mauro; KRYMCHANTOWSKI, Abouch Valenty; STEINBRUCH, Marcio; CUNHA, Karin Soares; RIBEIRO, Márcia Gonçalves; OLIVEIRA, Lisa; OZERI, David; DAHER, João Paulo Lima. **Utilização do diclofenaco na prática clínica: revisão das evidências terapêuticas e ações farmacológicas**. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 1, p. 29-38, jan. 2012. Disponível em: http://www.sbcm.org.br/revistas/RBCM/RBCM-2012-01.pdf#page=26. Acesso em: 07 dez. 2020.

GOLAN, David E.; TASHJIAN JUNIOR, Armen H.; ARMSTRONG, Ehrin J.; ARMSTRONG, April W. **Princípios da Farmacologia**: **A Base Fisiopatológica da Farmacologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. 974 p.

GIL FERREIRA, F.; MARTINS DE SOUZA, J.; SOLDATELLI PAGNO PAIM, R.; **Prevalência da Automedicação em Acadêmicos de Enfermagem em uma Faculdade de Caxias do Sul.** Revista Contexto & Saúde, 2019

INTERFARMA - Associação da Indústria Farmacêutica de Pesquisa (org.). **Guia Interfarma 2019**. São Paulo: Interfarma, 2019. 38 p. Disponível em: https://www.interfarma.org.br/guia/guia-2019/#. Acesso em: 06 dez. 2020.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia: básica e clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

MUSIAL, D. C.; DUTRA, J. S.; BECKER, T. C. A.; **A Automedicação entre os Brasileiros**; Sa-Bios: Revista de Saúde e Biologia; 2007

PRIETSCH, Rafael da Fonseca. **Estudo da Prescrição do Antidepressivo Fluoxetina no Tratamento para a Depressão na Cidade de Pelotas**. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Pelotas, v. 12, n. 2, p. 52-71, jul. 2015. Disponível em: file:///C:/Users/rspra/Downloads/25350-Texto%20do%20 artigo-153189-1-10-20150713.pdf. Acesso em: 10 dez. 2020.

REQUETIM, Luís Ricardo Charneca. **A utilização em terapêutica de substâncias com atividade nootrópica**. 2013. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade do Algarve, Portugal, 2013. Disponível em: http://hdl.handle.net/10400.1/6885. Acesso em: 10 dez. 2020.

SCHRÖR, K. **Acetylsalicylic acid**. 1. ed. Weinheim: Wiley-Blackwell, 2009.

SEABRA, Carolina Isabel Ribeiro. **Farmacocinética do Ibuprofeno**. 2014. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal, 2015. Disponível em: https://bdigital.ufp.pt/handle/10284/5305. Acesso em: 06 dez. 2020.

SIMÃO, Monique S. **Desenvolvimento de um modelo farmacocinético com fundamentação fisiológica para a aspirina.** 2017. 69 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2017

SIQUEIRA, T. C.; SATO, M. D. O.; SANTIAGO, R. M. **Reações Adversas em Usuárias de Anticoncepcionais**; Revista Eletrônica de Farmácia, v. 14, n. 4, 8 mar. 2018

SOUZA L. K. **Interação medicamentosa entre anticoncepcionais orais hormonais combinados e antibióticos.** [monografia] Brasília (DF): Faculdade de Ciências da Educação e Saúde; 2015.

TAVARES, Cristiane; SAKATA, Rioko Kimiko. **Cafeína para o Tratamento de Dor**. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, São Paulo, v. 62, n. 3, p. 387-401, maio 2012. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0034- 70942012000300011&script=sci_abstract&tlng=es. Acesso em: 07 dez. 2020.

TOMASINI, A. A.; FERRAES, A. M. B.; SANTOS, J. S.; **Prevalência e Fatores da Automedicação entre Estudantes universitários do Norte do Paraná**; Revista Biosaúde; 2015

WHALEN, Karen; FINKEL, Richard; PANAVELIL, Thomas A. **Farmacologia Ilustrada**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. 680 p.

WHO; World Health Organization. **Guinesline for the Regulatory Assessment of Medicinals Products for use in Self-Medication**. Geneva, p.4, 2000

CAPÍTULO 2

ANÁLISE COMPARATIVA DAS FIBRAS COLÁGENAS E DAS FIBRAS ELÁSTICAS DE CORONÁRIAS E CARÓTIDAS EM PACIENTES AUTOPSIADOS

Data de aceite: 26/05/2021

Data de submissão: 25/03/2021

Luciano Alves Matias da Silveira
Instituto de Ciências Biológicas e Naturais
Departamento de Cirurgia. Instituto de Ciências da Saúde
Universidade Federal do Triângulo Mineiro–UFTM
Uberaba, Minas Gerais
http://lattes.cnpq.br/5516531092140004

Gabriela Ribeiro Juliano
Instituto de Ciências Biológicas e Naturais
Universidade Federal do Triângulo Mineiro–UFTM
Uberaba, Minas Gerais
http://lattes.cnpq.br/6416222965498725

Laura Sanches Aguiar
Instituto de Ciências Biológicas e Naturais
Universidade Federal do Triângulo Mineiro–UFTM
Uberaba, Minas Gerais
http://lattes.cnpq.br/6491321852155817

Guilherme Ribeiro Juliano
Instituto de Ciências Biológicas e Naturais
Universidade Federal do Triângulo Mineiro–UFTM
Uberaba, Minas Gerais
http://lattes.cnpq.br/3784149356663494

Bianca Gonçalves Silva Torquato
Instituto de Ciências Biológicas e Naturais
Universidade Federal do Triângulo Mineiro–UFTM
Uberaba, Minas Gerais
http://lattes.cnpq.br/0408965179247848

Mariana Silva Oliveira
Instituto de Ciências Biológicas e Naturais
Universidade Federal do Triângulo Mineiro–UFTM
Uberaba, Minas Gerais
http://lattes.cnpq.br/9387404424249448

Fernando Pimenta de Paula
Instituto de Ciências Biológicas e Naturais
Universidade Federal do Triângulo Mineiro–UFTM
Uberaba, Minas Gerais
http://lattes.cnpq.br/5526580337076001

Marina Guerra Rotelli
Departamento de Cirurgia. Instituto de Ciências da Saúde
Universidade Federal do Triângulo Mineiro–UFTM
Uberaba, Minas Gerais
http://lattes.cnpq.br/4631618423907756

Isadora Ignácio Lourenço
Departamento de Cirurgia. Instituto de Ciências da Saúde
Universidade Federal do Triângulo Mineiro–UFTM
Uberaba, Minas Gerais
http://lattes.cnpq.br/2714363578282286

Vicente de Paula Antunes Teixeira
Instituto de Ciências Biológicas e Naturais
Universidade Federal do Triângulo Mineiro–UFTM
Uberaba, Minas Gerais
http://lattes.cnpq.br/6788700810093027

Mara Lúcia da Fonseca Ferraz
Instituto de Ciências Biológicas e Naturais
Universidade Federal do Triângulo Mineiro–UFTM
Uberaba, Minas Gerais
http://lattes.cnpq.br/9852478909273401

RESUMO: Introdução: Prever um risco cardiovascular é uma meta de estudos para diversas linhas de pesquisa. Estudos procuram provar uma associação entre a aterosclerose existente nas artérias carótidas e coronárias. **Objetivos:** Analisar morfologicamente as fibras

colágenas e fibras elásticas das artérias carótidas e coronárias de pacientes autopsiados e verificar associação entre elas. **Metodologia:** Após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Institucional, foram coletados fragmentos das carótidas comum direita (CD) e esquerda (CE) e coronárias descendente anterior (DA), descendente posterior (DP) e circunflexa (Cx) de 22 pacientes autopsiados da Disciplina de Patologia Geral. Após coletas, esses fragmentos foram encaminhados à confecção de lâminas, com colorações de Picrosirius, para quantificação de fibras colágenas, e Verhoeff, para quantificação de fibras elásticas. Foi utilizado o sistema Leica Qwin Plus® para quantificação das fibras colágenas e elásticas. A análise estatística foi realizada através do software Graphpad Prism® 5, com significância com $p<0,05$. **Resultados:** Foram analisados 22 laudos de autópsias, no qual 59% eram do gênero masculino (13) e 72,7% eram de cor branca (16). A mediana de idade foi de 45 anos (25 – 74). Quanto ao IMC, os pacientes apresentaram média de 22,16 ± 5,51 kg/m^2. Através da análise realizada para quantificação de fibras colágenas, obteve-se a mediana em coronárias DA (3,085%), DP (3,270%) e Cx (1,9%) da área analisada. Em CD (2,895%) e CE (2,805%). Quando realizado a quantificação de fibras elásticas, obteve-se a mediana em coronárias DA (5,595%), DP (5,870%) e Cx (5,735%) da área analisada. Em CD (6,195%) e CE (5,890%). Houve diferença significativa apenas na coloração de Picrosirius entre a Cx e as CD ($t = 2,197$; $p<0,05$) e CE ($t = 2,212$; $p<0,05$). Não houve diferença significativa entre outras associações das artérias ($p>0,05$). **Conclusões:** As análises realizadas demonstram que o processo de formação aterosclerótica é comum entre as artérias demonstrado pelas fibras colágenas e elásticas, o que corrobora a literatura de que se trata de um processo inflamatório sistêmico, o qual acomete diversos leitos arteriais concomitantemente. Sendo assim, estudos para predizer riscos ateroscleróticos devem ser estimulados, a fim de se reduzir a morbimortalidade relacionada a essas doenças.
PALAVRAS-CHAVE: Aterosclerose; doenças das artérias carótidas; doença da artéria coronariana.

COMPARATIVE ANALYSIS OF ELASTIC AND COLLAGEN FIBERS OF CORONARY AND CAROTID ARTERIES IN AUTOPSIED PATIENTS

ABSTRACT: Introduction: Several lines of research are aimed at predicting cardiovascular risks, so many researchers have studied carotid arteries in an attempt to establish a correlation between carotid and coronary artery atherosclerosis. **Objectives:** To analyze the morphology of the carotid and coronary arteries of autopsied patients and to assess the correlation between them. **Methods:** After approval of the Research Ethics Committee of the Federal University of Triangulo Mineiro, sections of the right common carotid artery (RCCA), of the left common carotid artery (LCCA), of the anterior descending coronary artery (ADCA), of the posterior descending coronary artery (PDCA), and of the circumflex coronary artery (Cx) were collected from 22 autopsied patients at the Department of General Pathology. Then these sections were mounted on glass slides with Picrosirius red staining for quantification of collagen fibers and with Verhoeff's stain for quantification of elastic fibers. Leica Qwin Plus® software was used to quantify collagen and elastic fibers. Statistical analysis was performed using Graphpad Prism® 5 software, with a significance of $p<0.05$. **Results:** Autopsy reports of 22 patients were analyzed, 59% of which were male (13) and 72.7% were white (16). The mean age was

45 years (25-74), and the mean BMI was 22.16 ± 5.51 kg/m^2. After quantification of collagen fibers, the median ADCA (3.085%), PDCA (3.270%), Cx (1.9%), RCCA (2.895%) and LCCA (2.805%) of the analyzed area were obtained. The median values for quantification of elastic fibers were also obtained for ADCA (5.595%), PDCA (5.870%), Cx (5.735%), RCCA (6.195%) and LCCA (5.890%) of the analyzed area. There was a significant difference only in Picrosirius staining, between Cx and RCCA ($t=2.197$, $p<0.05$) and LCCA ($t=2.212$, $p<0.05$). There was no significant difference between the other correlations of arteries investigated ($p>0.05$). **Conclusion:** The analyses performed show that the initial process of atherosclerotic formation is common across different arteries, thus corroborating the literature, which regards it as a systemic inflammatory process affecting several arterial beds. Therefore, studies aiming to predict atherosclerotic risks must be encouraged in order to reduce the morbidity and mortality rates associated with these diseases.
KEYWORDS: Atherosclerosis; Carotid artery diseases; Coronary artery disease.

1 I INTRODUÇÃO

Estudos em autopsias são necessários à prática médica. Relatos apontam a primeira autopsia datada de 3000 a.c., no Egito Antigo, difundindo-se posteriormente para as regiões atuais da Grécia e da Alemanha. De origem grega, a palavra autopsia significa “ver por si mesmo”, caracterizando seu real objetivo de realizar associações entre causa de morte e doenças correlatas e, pois, auxiliar no diagnóstico final de causas de morte desconhecidas. No século XIX, Kaul Rokitansky foi considerado o pai da autopsia moderna, delineando suas principais investigações por órgãos e tecidos, e Rudolph Virchow que trouxe o marco da necessidade da avaliação através dos estudos microscópicos na complementação diagnóstica. (COSTACHE *et al.*, 2014).

No século XX, o número de autopsias reduziu significativamente, devido a novas tecnologias diagnósticas que surgiram e a redução do interesse da classe médica em solicitar o exame. Dados do *National Center for Health Statistics (NCHS)*, dos Estados Unidos da América (EUA), demonstraram uma redução de 19,1% para 8,5% entre 1972 a 2007, incluindo autopsias clínicas e forenses (HOYERT, 2011). Em um estudo australiano, demonstrou-se redução de 50% nas autopsias realizadas no periodo de 1992 a 2003, fenômeno que ocorre mundialmente (COSTACHE *et al.*, 2014). Entretanto, defensores ainda relatam a importância da autopsia na elucidação diagnóstica, assim como correlação das múltiplas doenças associadas a causa morte e possibilidade do uso microscópico para adentrar na fisiopatogênese. Além disso, sabe-se que a autopsia é substrato para inúmeras indagações que levam a pesquisas científicas, contribuindo com o avançar do conhecimento na área de ciências de saúde (COSTACHE *et al.*, 2014).

A doença cardiovascular é uma das causas mais relevantes de mortalidade em todo mundo (NASCIMENTO et al., 2014). Estima-se que uma em cada duas mortes nos países desenvolvidos seja decorrente de doenças associadas a patologias cardiovasculares

(ROGER *et al.*, 2011), o que, segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC), corresponde a aproximadamente 300 mil óbitos por ano somente no Brasil. A doença arterial é responsável por grande parte da incidência de mortalidade na população, sendo menos frequentes as complicações venosas. E, no âmbito arterial, a aterosclerose é a responsável por muitos dos eventos cardiovasculares nos países ocidentais (VAN DAM *et al.*, 2016).

Estimativas recentes realizadas nos EUA demonstraram que um terço da população apresenta algum tipo de doença cardiovascular, o que corresponderia a 71,3 milhões de habitantes naquele país. E, dessas, 17 milhões apresentam doença arterial coronariana e 10 milhões com sintomatologia clínica de *angina pectoris* (FIHN *et al.*, 2012; LLYOD-JONES *et al.,* 2010). Mesmo com os últimos avanços em terapias medicamentosas e intervencionistas no tratamento da aterosclerose e de suas repercussões clínicas importantes, estima-se que em 2030 acima de 23,6 milhões de pessoas no mundo apresentem óbitos relacionados a doenças ateroscleróticas, o que representa um grande impacto na saúde pública mundial (YAHAGI, 2016).

Apesar de ser substrato para diversas pesquisas em todo o mundo, a fisiopatologia da aterosclerose ainda permanece não totalmente esclarecida, o que é visto em artigos que são publicados anualmente a respeito do desenvolvimento dessa doença. Um estudo na literatura mostra que, aproximadamente, mais de cinco mil trabalhos são publicados anualmente sobre a fisiopatologia correlacionada a aterosclerose (BODARY, EITZMAN, 2006). Os conhecimentos iniciais a respeito da fisiologia e patogenia aterosclerótica são originários dos estudos do pesquisador Rudolph Carl Virchow, Professor de Patologia, que iniciou as pesquisas sobre a fisiopatologia da aterosclerose em 1858. Na ocasião, o pesquisador defendeu a teoria de que a aterosclerose se desenvolvia através de estímulos extrínsecos às células da parede arterial, e que essas células afetariam outras células adjacentes. Ademais, o pesquisador sugeriu que o acúmulo de lipídeos e a proliferação celular na parede arterial eram o marco inicial para o desenvolvimento aterosclerótico (BODARY, EITZMAN, 2006).

Na mesma década, outro pesquisador importante nos esclarecimentos iniciais da fisiopatologia da aterosclerose foi Rokitansky que descreveu o desenvolvimento inicial da aterosclerose como sendo uma deposição de fibrina na parede arterial e a persistência dessa deposição levaria a alterações estruturais deletérias que culminariam com o processo patológico (BODARY, EITZMAN, 2006).

Sabe-se que a chave central da doença se encontra em pacientes com níveis sanguíneos elevados de colesterol, a hipercolesterolemia, associado à disfunção endotelial, ao processo inflamatório agudo, ao processo inflamatório crônico e ao processo trombogênico. O acúmulo de lipídeos na parede arterial ocorre de forma proporcional à sua concentração na corrente sanguínea (SANTOS-GALLEGO, PICATOSTE, BADIMÓM, 2014). Entender as alterações fisiológicas e fisiopatológicas da parede arterial é fundamental para

o desenvolvimento de estratégias de impacto preventivo e de possibilidades terapêuticas (JASHARI et al., 2013).

Nos EUA, a doença cardiovascular encontra-se em primeiro lugar como causa de mortalidade e as doenças cerebrovertebrais (Acidente Vascular Encefálico hemorrágico (AVEh) ou isquêmico (AVEi)) em quarto lugar, em revisões de comissão de óbitos realizadas no ano de 2010. (HERON, 2013). No Brasil, essas doenças também representam a principal causa de mortalidade, sendo responsáveis por grande parte dos óbitos na população acima de trinta anos de idade (MANSUR, FAVARATO, 2016.)

Sabe-se que o desenvolvimento patológico inicial da aterosclerose se dá primordialmente pelo aumento dos níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL - *Low Density Lipoprotein*), o que acarreta o início do processo inflamatório agudo na parede arterial de forma sistêmica. Isso pode ser confirmado através da redução da mortalidade cardiovascular mundial após a introdução das estatinas no tratamento da hipercolesterolemia (GOULD, *et al.*, 1998). Ou seja, o aumento por si só dos níveis de colesterol é capaz de desencadear o processo inflamatório agudo e posteriormente crônico na parede arterial. A LDL possui a capacidade de estimular células endoteliais a produzir moléculas pró-inflamatórias, como moléculas de adesão, citocinas (IL-1 e IL-6) e quimiocinas. Ainda, existe uma participação crucial de monócitos, os quais se diferenciam em macrófagos, e células de linhagem T. Associado a essa cascata inflamatória, existem os elementos naturais da parede arterial que interagem a nível celular. Essa interação, que ocorre ao longo de vários anos, leva a lesões da parede arterial e a formação de placas, que em algum momento podem levar a um processo trombogênico ou a uma ruptura de placa, com consequente oclusão arterial. A oclusão arterial aguda é a chave central do evento clínico das situações de infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral (JASHARI et al., 2013).

A deposição de derivados lipídicos provoca lesões endoteliais, com inúmeras mudanças nas túnicas íntima e média arterial, o que altera a conformação dos componentes subendoteliais. Um aumento generalizado da síntese e deposição de matriz extracelular (MEC), como glicosaminoglicanos, fibras colágenas e fibras elásticas, pode ser resultado do aumento indiscriminado de células musculares lisas nas camadas íntima e média por migração e neoformação celular. Concomitante, existe uma produção de fatores de crescimento que aumentam a expressão de genes responsáveis pela produção de fibras colágenas e elásticas em uma variedade de células subendoteliais (MORTON, BARNES, 1982; IGNOTZ, MASSAGUE, 1986). Esse remodelamento arterial pode provocar alterações no diâmetro e na espessura do vaso, o que leva a uma disfunção da homeostase arterial (STRONG, 1992).

Inicialmente, as alterações decorrentes da aterosclerose acomentem principalmente as artérias em regiões de origens, bifurcações e ramos. Entretanto, com o avançar das décadas de vida podem acomenter outros sítios do corpo humano. Com o inicio da inflamação da parede arterial em decorrência da lesão endotelial, células musculares lisas na túnica

íntima são capazes de sintetizar fibras colágenas e elásticas, assim como suas migrações por frenestrações da lâmina elástica interna. Essa migração ocorre por quimiotaxia induzida por citocinas e quimiocinas, o que acarreta em um aumento subendotelial da parede arterial (BASSI, GARCIA, MIRANDA NETO, 1997).

Em decorrência de um longo período evolutívo em sua formação, a *American Heart Association* (AHA) optou por definir em classificações as inúmeras apresentações da placa aterosclerótica (STARY, 2000). **Tabela 1**.

Tipo 1: Células espumosas isoladas na túnica íntima arterial;
Tipo 2: Ínumeras células espumosas organizadas em camadas;
Tipo 3: Conjunto de lipídeos extracelulares sem um núcleo bem definido;
Tipo 4: Núcleo lipídico bem definido recoberto por uma íntima íntegra;
Tipo 5: Núcleo lipídico com cápsula fibrosa com ou sem calcificação (fibroateroma);
Tipo 6: Fibroateroma com cápsula fibrosa com defeitos, como hemorragia ou tromobose;
Tipo 7: Calcificações proeminentes à luz arterial;
Tipo 8: Tecido fibroso proeminente à luz arterial;

Tabela 1: Classificação da placa aterosclerótica segundo a *American Heart Association (AHA)*

As coronárias se originam distalmente a valva aórtica, nos seios de Valsalva, e são arterias de, aproximadamente, 5 a 10 cm de comprimento e possuem um diametro de, aproximadamente, 3 mm. São responsáveis pela irrigação arterial do coração e oclusões, em qualquer parte de suas extensões, podem levar a um desequilíbrio da oferta e consumo de oxigênio, desecandeando um evento isquêmico agudo, como a síndrome coronariana. As três principais coronárias são: descendente anterior esquerda, circunflexa e coronaria direita, sendo a descendente posterior ramo direto da coronária direita (ROBBINS, 2005).

No período embriológico, no decorrer da quarta semana do desenvolvimento, os arcos faríngeos se desenvolvem, e são supridos por artérias que são os arcos aórticos. As carótidas comuns são derivadas da porção proximal do terceiro par de arcos aórticos. As porções distais do terceiro par se juntam com as aortas dorsais para formar as carótidas internas. O primeiro arco aórtico contribui para formação das artérias carótidas externas (MOORE, 2004).

O arco da aorta dá origem a três ramos principais: da direita para a esquerda, esses ramos são o tronco braquiocefálico, a artéria carótida comum esquerda e a artéria subclávia esquerda. O tronco braquiocefálico origina a artéria carótida comum direita e a artéria subclávia direita. As artérias carótidas comum direita e esquerda ascendem até o nível da 4º vértebra cervical ou da borda superior da lâmina da cartilagem tireoide, quando então se bifurcam em artéria carótida externa, medialmente, e artéria carótida interna,

lateralmente (GARDNER, 1999).

Estruturalmente, as artérias são constituídas por 3 túnicas. As túnicas íntima, média e adventícia. A túnica intíma, a mais interna, é composta pelo endotélio, sustentado por tecido conjuntivo frouxo em pequena quantidade, e separada pela túnica média pela lâmina elástica interna. A túnica média é composta por células musculares lisas, fibras elásticas e colágenas, e é separada pela adventícea pela lâmina elástica externa. A adventícea, a mais externa, é constituida basicamente de tecido colágeno e elástico (GARDNER, 1999). Com o avançar da idade, ocorre o surgimento de uma camada fibrosa entre a túnica íntima e túnica média (BASSI, GARCIA, MIRANDA NETO, 1997).

Sabe-se que o fator de risco de maior impacto na fisiopatogênese da aterosclerose é o avançar da idade. O consagrado estudo realizado na cidade de Framingham, no estado norte-americano de Massachusetts, demonstrou que, após os quarenta anos de idade, 49% dos homens e 32% das mulheres apresentam uma doença arterial coronariana em desenvolvimento (LLOYD-JONES et al., 1999). Entretanto, estudos em autopsias fetais demonstraram que a fase pré-clínica, constituída de acúmulo de lipídeos subendoteliais e fagocitose pelos monócitos diferenciados em macrófagos, em que se origina as células espumosas, podem ser encontradas durante o desenvolvimento fetal, com presença de estrias de lipídeos nos principais leitos arteriais do corpo humano. Isso demonstra que o desenvolvimento da inflamação crônica da parede arterial pode ocorrer ainda no desenvolvimento gestacional (NAPOLI, 2007).

Existem diversos fatores de risco estabelecidos pela literatura mundial no desenvolvimento da aterosclerose. São divididos em fatores de risco modificáveis e fatores não modificáveis, esses relacionados ao componente genético próprio do paciente. Dentre os fatores de risco modificáveis ou relacionados ao ambiente, pode-se listar o tabagismo, o uso de drogas - como a cocaína - a ausência ou baixa prática de atividade física regular, alimentação desiquilibrada - com dietas ricas em gorduras - e agentes infecciosos – de forma aguda ou crônica. Em contrapartida, há aqueles fatores de risco com significativo cunho genético, como o diabetes mellitus, a hipertensão arterial sistêmica, o sexo masculino, a síndrome metabólica (associada a resistência periférica a insulina e obesidade), elevações dos níveis de homocisteína e fatores hemostáticos (como o fibrinogênio), e elevações dos níveis de LDL e redução dos níveis da lipoproteína de alta densidade (HDL - *High density lipoprotein*) (TENDERA, ABOYANS, BARTELINK, 2011). **Tabela 2**.

Fatores não genéticos
Ausência de atividades físicas regulares
Dieta rica em alimentos gordurosos
Processo infeccioso agudo ou crônico
Tabagismo
Uso de drogas
Fatores com componente genéticos
Diabetes mellitus
Elevação de lipoproteínas
Elevação dos níveis de fibrinogênio
Elevação dos níveis de homocisteína
Elevação dos níveis de LDL e VLDL
Hipertensão arterial sistêmica
História familiar
Obesidade
Redução dos níveis de HDL
Sexo masculino
Síndrome metabólica (Resistência insulínica)

Tabela 2: Fatores de risco relacionados ao desenvolvimento da aterosclerose

Diversos estudos apontam o consumo regular de álcool como preventivo às doenças cardiovasculares, porém não totalmente esclarecido. Sabe-se que, com um consumo diário de álcool de modo moderado, existe uma redução dos níveis de LDL colesterol – de característica aterogênica – e aumento dos níveis de HDL colesterol – de característica cardioprotetora. Os níveis de triglicerídeos são incertos se há o aumento ou a redução em pessoas com ingesta de álcool regular. Porém, apesar de haver esse aumento de HDL e redução de LDL, sabe-se que existem inúmeros outros efeitos nocivos do álcool relacionados a saúde da população, o que leva ao estímulo de um consumo mínimo para seu efeito cardioprotetor (TABARA et al., 2017).

Estudos mais recentes apontam o papel da vitamina D na fisiopatogênese da aterosclerose, em que atuaria na resposta imune e inflamatória, além do papel na trombogênese, o que acarreta instabilidade na doença arterial coronariana. Nardin et al (2016) compararam dois fatores de risco relacionados a aterosclerose, o diabetes mellitus e a hipovitaminose D, em pacientes que foram submetidos a angiografia coronariana, em que se percebeu que pacientes portadores de diabetes com hipovitaminose D possuíam maior prevalência e severidade da doença arterial coronariana (QUERFELD, 2013; BUITRAGO, ARANGO, BOLAND, 2012).

A presença de infecções agudas ou crônicas já foi citada como contribuinte da

patogenia da disfunção endotelial arterial, seja por vírus ou bactérias (ROSENFELD, CAMPBELL, 2011). Uma associação entre infecção pela Influenza com aumento do risco de eventos cardiovasculares já foi relatada (JASHARI, IBRAHIMI, NICOLL et al., 2013). Ainda, alguns autores sugerem que componentes bacterianos isolados são capazes de desencadear a aterosclerose (WESTERTERP, BERBÉE, PIRES et al., 2007). Silveira et al (2013) demonstraram um aumento significativo de fibras colágenas na aorta de pacientes portadores de infecção fúngica sistêmica. As infecções agudas ou crônicas podem contribuir com a aterosclerose no desencadeamento de uma resposta inflamatória sistêmica, levando a uma desestabilização da lesão aterosclerótica endotelial, podendo muitas vezes levar a ruptura e trombose do leito arterial (JASHARI, IBRAHIMI, NICOLL et al., 2013).

Os pesquisadores buscam uma interpretação da aterosclerose de forma não invasiva, a fim de prever um risco cardiovascular do paciente. Para isso, estudos são realizados obtendo-se formas de rastreio ou *screening* dos pacientes que apresentem fatores de risco conhecidos para o desenvolvimento de aterosclerose. Entretanto, ainda existem controvérsias na literatura. Em um estudo recente, Rau et al (2016) compararam o uso de tomografia computadorizada (TC) coronariana e cinecoronariografia em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV - *Human Immunodeficiency Virus*), concluindo que a angiografia nesses pacientes se mostrou superior à tomografia computadorizada na detecção da aterosclerose. Nessa linha de pesquisa, Baroncini et al (2016) demonstraram a importância da ultrassonografia em pacientes pediátricos, utilizando-se o método não invasivo em carótidas, demostrando aumento da espessura da parede arterial relacionado a idade e ao Índice de Massa Corporal (IMC). Prever um risco cardiovascular é uma meta de estudos para diversas linhas de pesquisa. Através do estudo das carótidas, tenta-se provar uma correlação entre a aterosclerose existente na artéria carótida e nas artérias coronarianas, buscando associação entre elas (KAZUM et al., 2016; ASCHER et al., 2001; WANAMAKER et al., 2012; CHUN et al., 2014; DURAND et al., 2004; STEINVIL et al., 2011).

O mecanismo em torno do evento agudo cardiovascular envolvendo coronárias e carótidas é semelhante. A ruptura da capa fibrosa aterosclerótica ou a erosão superficial podem desencadear o contato do núcleo lipídico, rico em lipídios, fibras colágenas e elásticas, e fatores teciduais, com elementos do sangue, como fatores de coagulação e plaquetas, promovendo a trombose. Independente do mecanismo que ocorre, a desestabilização da placa pode levar a eventos como síndrome coronariana aguda e acidente vascular encefálico (JASHARI et al., 2013).

As complicações cardiovasculares são uma preocupação relevante que pode ocorrer no período perioperatório, o que leva a um desfecho desfavorável ao paciente, com altas taxas de morbimortalidade perioperatória. Pacientes portadores de doença arterial coronariana que são submetidos ao stress cirúrgico, associado a episódios de taquicardia e alterações de níveis pressóricos como hipotensão e hipertensão sustentadas,

podem apresentar um balanço negativo na oferta e consumo de oxigênio miocárdico, assim como situações de ruptura de placas estáveis ou instáveis e, assim, haver uma síndrome coronariana aguda (HOBAIKA, SEIBERLICH, ISSA, 2007). Ainda, pacientes que apresentam doença arterial em carótidas possuem risco aumentado no perioperatório de cirurgias de revascularização miocárdica, o que demonstra a importância do *screening* desses pacientes, buscando uma melhor qualidade na assistência pré-operatória e evitando intercorrências ao paciente (ABOYANS, LACROIX, 2009).

É mandatório que os fatores de risco no período perioperatório sejam investigados e a identificação dos pacientes com maior risco para doenças cardiovasculares devem ser conduzidos a fim de melhores resultados nesse período. Sabe-se que a mortalidade em cirurgias não cardíacas de pacientes de moderado e alto risco para doenças cardiovasculares situa-se entre 2 a 6%, respectivamente, e, provavelmente, aumente à medida que há o aumento do número de fatores de risco associados. Em um universo de, aproximadamente, 230 milhões de cirurgias de maior complexidade que ocorrem anualmente no mundo, esse número representa uma alta mortalidade nesse âmbito perioperatório (MÜLLER, ZOTT, 2013).

Após revisões na literatura, observa-se que ainda existem controvérsias sobre a associação fisiopatológica da aterosclerose apresentada em diferentes leitos arteriais, como coronárias e carótidas de pacientes. Entretanto, sabe-se que o processo inflamatório sistêmico é fator de risco para aterosclerose em ambos os leitos arteriais – coronarianos e carotídeos.

2 I OBJETIVOS

Avaliar o processo de desenvolvimento da aterosclerose presente em diferentes leitos arteriais de paciente autopsiados pela Disciplina de Patologia Geral no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (HC – UFTM).

3 I MATERIAIS E MÉTODOS

Através das autópsias realizadas por dois médicos patologistas pela Disciplina de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas e Naturais (ICBN) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), Uberaba - Minas Gerais, Brasil, foi realizado um estudo com seres humanos, quantitativo, observacional, transversal e descritivo. Foram analisados os laudos de autópsias realizadas pelas Disciplina de Patologia Geral no HC – UFTM no período de 2008 a 2014, em que foram selecionados os laudos de autópsias completos, independente da causa de morte ou doença de base.

Foram excluídos do estudo os casos que apresentavam laudos de autópsias incompletos com os dados analisados e ausência de material de coleta para análises

(coronárias e carótidas).

Foram coletados 110 fragmentos dos seguintes leitos arteriais: carótidas comum direita (CD) e carótidas comum esquerda (CE); e coronárias descendente anterior (DA), descendente posterior (DP) e coronária circunflexa (CX) para as análises microscópicas. Os fragmentos coletados de carótidas e coronárias foram fixados em formaldeído a 10%. Posteriormente, os fragmentos foram desidratados em álcoois com concentrações crescentes (70 a 100%), diafanizados em xilol e emblocados em parafina. Posteriormente, foram realizados cortes seriados de 4 µm de espessura e confeccionadas lâminas para as análises histopatológicas.

Foram feitas colorações específicas para fibras colágenas através do Picrosírius (solução aquosa saturada de ácido pícrico adicionada de 0,1g% de vermelho da Síria F3b, Sirius red F3B-Bayer) com contra-coloração pela hematoxilina (JUNQUEIRA, BIGNOLAS e BRENTANI 1979). A quantificação do colágeno foi realizada nas camadas íntima e média das artérias carótidas e das coronárias, em que foram examinadas sob luz polarizada, com objetiva de 20x de acordo com a espessura da camada. Para esta quantificação todos os campos do corte foram digitalizados. Dessa forma, a imagem do campo quantificado foi digitalizada por meio de uma câmera acoplada ao microscópio. A área de colágeno com aspecto birrefrigente com cor em geral, amarelo/alaranjado foi marcada pelo observador para obter-se o percentual (%) de colágeno por área do campo analisado nas lâminas. Essas medidas foram obtidas por meio do sistema analisador de imagens interativo Leica QWin Plus® (Leica Microsystems, Inc., Wetzlar, Germany), na objetiva de 20x (aumento final 800x).

Foram feitas colorações específicas para fibras elásticas através de Verhoeff para a obtenção da porcentagem (%) de fibras elásticas nas camadas íntima e média. Após a digitalização da imagem como descrito anteriormente, a área de fibras elásticas com aspecto enegrecido foi marcada pelo observador para obter-se o percentual de fibras elásticas por área do campo analisado nas lâminas. Essas medidas foram obtidas por meio do sistema analisador de imagens interativo Leica QWin Plus® (Leica Microsystems, Inc., Wetzlar, Germany), na objetiva de 20x (aumento final 620x).

O número de campos para avaliação das medidas das camadas íntima e média foi definido pelo cálculo da Média Acumulada (WILLIAMS, 1977).

4 I ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foi elaborada uma planilha eletrônica no Microsoft Excel 2016®. As informações foram analisadas de forma estatística utilizando-se o programa eletrônico software Graphpad Prism 5.0. A verificação da distribuição normal das variáreis quantitativas foi feita pelo teste de Shapiro-Wilk. As variáveis contínuas que apresentarem distribuição normal foram expressas em média e desvio padrão (x ± dp), e aquelas que

apresentarem distribuição não normal foram expressas em mediana, mínimo e máximo (med, min-max). As variáveis que apresentarem distribuição normal e variância homogênea foram analisadas pelo teste "t" de Student; caso contrário, foram analisadas pelo teste de Mann Whitney (U). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando a probabilidade de erro for menor que 5% ($p<0,05$).

5 I ASPECTOS ÉTICOS

O projeto de pesquisa do presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (CEP/UFTM), protocolo nº 1683/2010.

6 I RESULTADOS

Foram analisados 22 laudos de autópsias realizadas pela Disciplina de Patologia Geral do HC - UFTM. Os pacientes autopsiados apresentavam mediana de idade de 45 anos, com idade mínima de 25 anos e máxima de 74 anos. Quanto ao IMC, os pacientes apresentaram média de 22,16 ± 5,51 kg/m^2. As outras informações descritivas dos pacientes podem ser vistas na **Tabela 3**.

Características gerais	**%**
Gênero	
Masculino	59
Feminino	41
Etnia	
Brancos	72,7
Não brancos	27,3
Causa de morte	
Cardiovascular	22,7
Infecciosa	63,6
Digestória	9
Neoplásica	4,7

Tabela 3: Características gerais da amostra de pacientes autopsiados na Disciplina de Patologia Geral do HC – UFTM utilizados no estudo

Através da análise realizada pela coloração de Picrosirius, para quantificação por campo (%) de fibras colágenas, obteve-se a mediana em carótidas direita (2,895%) e esquerda (2,805%). Em coronárias descendente anterior (3,085%), descendente posterior (3,270%) e circunflexa (1,9%) da área analisada. **Tabela 4**.

Leito Arterial	Mediana (%)	(Min – Max %)
Carótida Direita	2,895	0,09 – 7,7
Carótida Esquerda	2,805	0,51 – 9,56
Coronária DP	3,270	0,1 – 14,79
Coronária DA	3,085	0,07 – 19,15
Coronária Cx	1,9	0,1 – 18,48

min = mínimo; max = máximo

Tabela 4: Quantificação por campo de imagem (%) de fibras colágenas em diferentes leitos arteriais de pacientes autopsiados

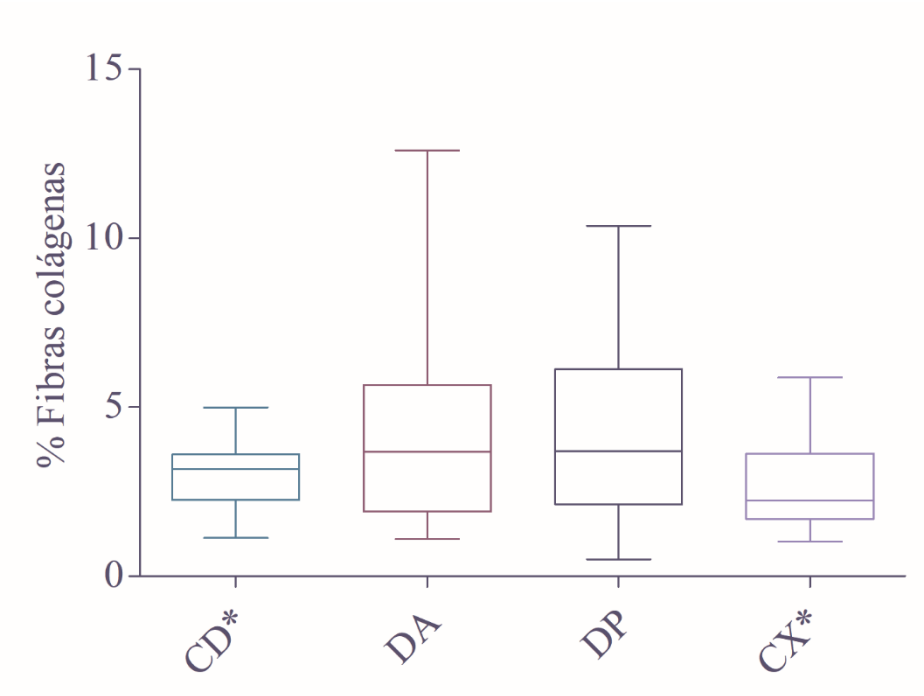


Figura 1: Box-plot com mediana e intervalos interquartil das medidas por campo de imagem (%) de fibras colágenas mensuradas na carótida direita (CD) e nas coronárias descendente anterior (DA), descendente posterior (DP) e circunflexa (Cx) de pacientes autopsiados, através da coloração de Picrosirius. * *t = 2,197 ; p = 0,033.*

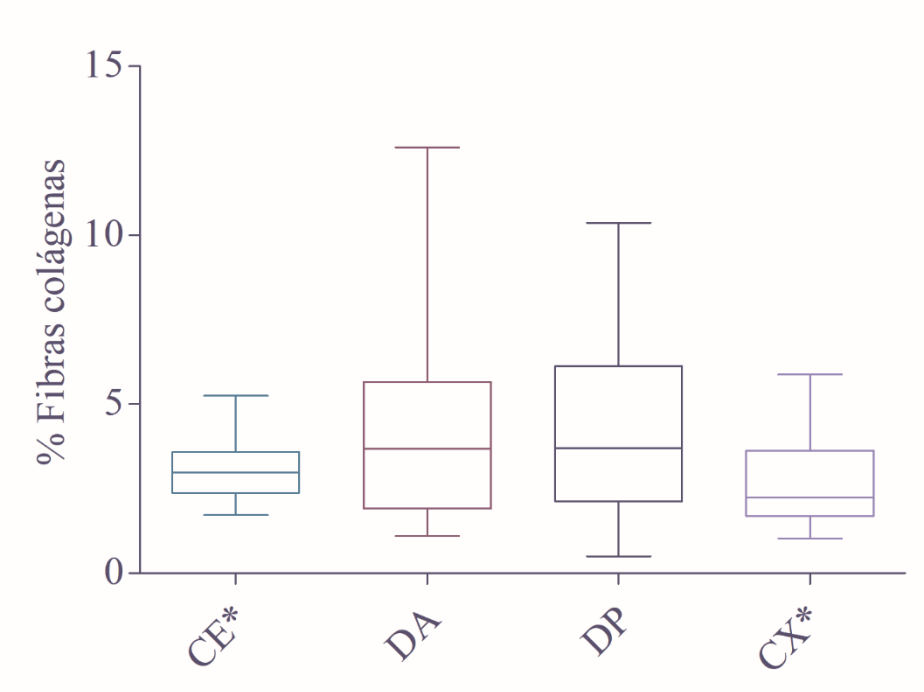


Figura 2: Box-plot com mediana e intervalos interquartil das medidas por campo de imagem (%) de fibras colágenas mensuradas na carótida esquerda (CE) e nas coronárias descendente anterior (DA), descendente posterior (DP) e circunflexa (Cx) de pacientes autopsiados, através da coloração de Picrosirius. * *t = 2,212; p = 0,032.*

A **Tabela 5** mostra a associação entre as diferentes carótidas (direita e esquerda) com as diferentes coronárias (descendente anterior, descendente posterior e circunflexa), quanto a mensuração, por porcentagem, das fibras colágenas, o qual mostra diferença significativa entre as carótidas direita e esquerda em relação a artéria circunflexa (p<0,05).

Carótida Direita		
Descendente Anterior	U = 193	p = 0,25
Descendente Posterior	U = 192	p = 0,245
Circunflexa	t = 2,197	p = 0,033*
Carótida Esquerda		
Descendente Anterior	U = 198	p = 0,307
Descendente Posterior	U = 177	p = 0,13
Circunflexa	t = 2,212	p = 0,032*

Tabela 5: Associação da mensuração (%) de fibras colágenas entre as arteriais carótidas direita e esquerda com as diferentes coronárias de paciente autopsiados no HC – UFTM.

Através da análise realizada pela coloração de Verhoeff, para quantificação por campo (%) de fibras elásticas, obteve-se a mediana em carótidas direita (6,195%) e carótida esquerda (5,89%). Em coronárias descentes anterior (5,595%), descendente posterior (5,870%) e circunflexa (5,735) da área analisada. **Tabela 6**.

Leito Arterial	Mediana (%)	(Min – Max %)
Carótida Direita	6,195	2,2 – 16,57
Carótida Esquerda	5,890	2,66 – 15,81
Coronária Cx	5,735	2,12 – 13,19
Coronária DA	5,595	1,15 – 14,46
Coronária DP	5,870	0,98 – 12,56

min = mínimo; max = máximo

Tabela 6: Quantificação por campo de imagem (%) de fibras elásticas em diferentes leitos arteriais de pacientes autopsiados

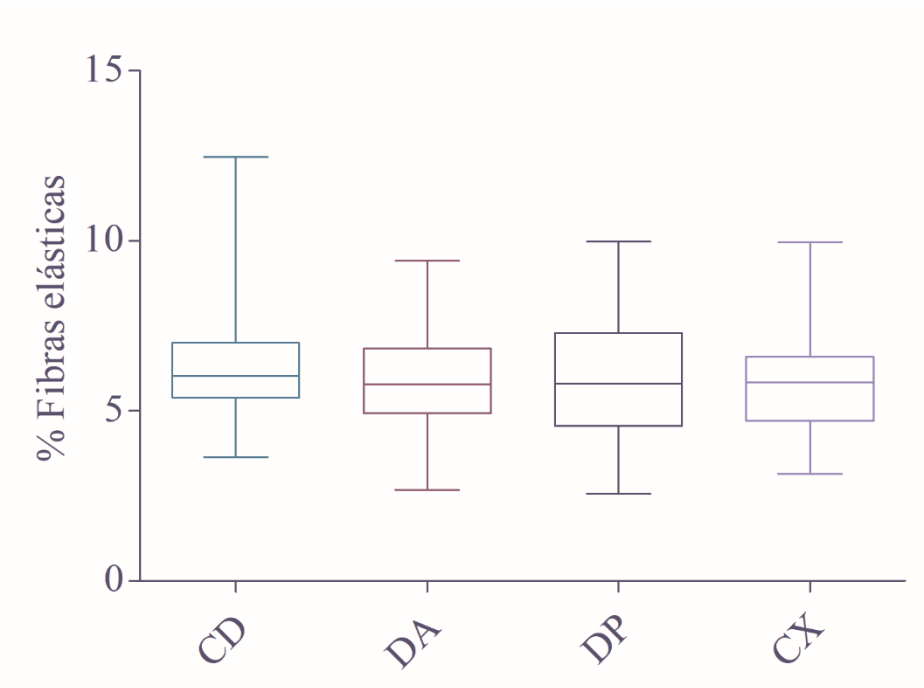


Figura 3: Box-plot com mediana e intervalos interquartil das medidas por campo de imagem (%) de fibras elásticas mensuradas na carótida direita (CD) e nas coronárias descendente anterior (DA), descendente posterior (DP) e circunflexa (Cx) de pacientes autopsiados, através da coloração de Verhoeff. *p>0,05*

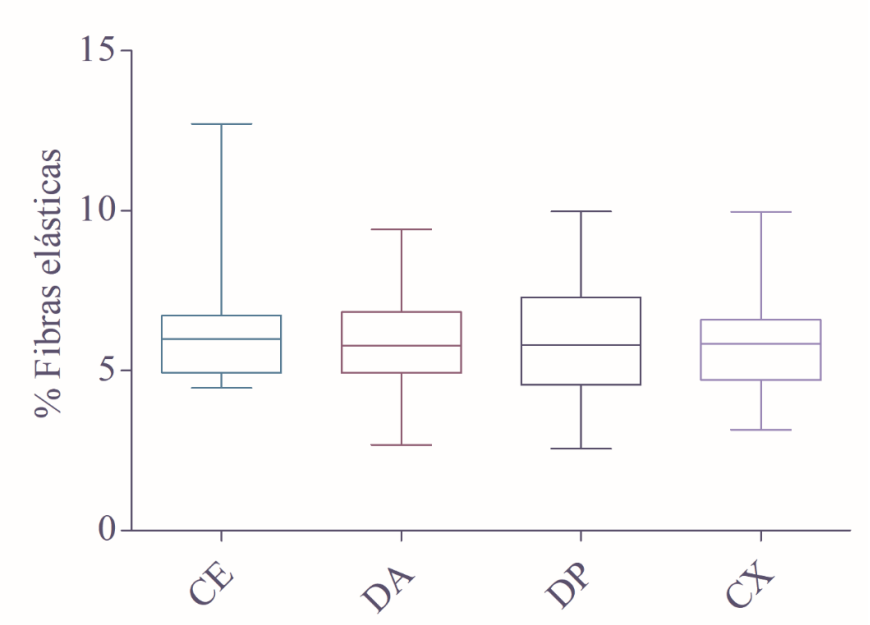


Figura 4: Box-plot com mediana e intervalos interquartil das medidas por campo de imagem (%) de fibras elásticas mensuradas na carótida esquerda (CE) e nas coronárias descendente anterior (DA), descendente posterior (DP) e circunflexa (Cx) de pacientes autopsiados, através da coloração de Verhoeff. *p>0,05*

A **Tabela 7** mostra a relação entre as carótidas direita e esquerda com as diferentes coronárias, quanto a mensuração por campo de imagem (%) de fibras elásticas, onde não há diferença significativa entre todos os leitos arteriais analisados.

Carótida Direita		
Descendente Anterior	U = 183	p = 0,169
Descendente Posterior	U = 199	p = 0,318
Circunflexa	U = 187	p = 0,200
Carótida Esquerda		
Descendente Anterior	U = 126	p = 0,716
Descendente Posterior	U = 232	p = 0,823
Circunflexa	U = 221	p = 0,603

Tabela 7: Associação da mensuração (%) de fibras elásticas entre as arteriais carótidas direita e esquerda com as diferentes coronárias de pacientes autopsiados no HC – UFTM.

Quando se analisa os pacientes sob os gêneros masculino e feminino, não houve diferença significativa entre todas as carótidas e coronárias analisadas conforme visto na **Tabela 8**.

Gênero Feminino					
Fibras colágenas			**Fibras elásticas**		
CD x Cx	t = 1,496	p = 0,854	**CD x Cx**	t = 1,864	p = 0,08
CD x DA	t = 2,171	p = 0,05	**CD x DA**	t = 1,898	p = 0,675
CD x DP	t = 0,4052	p = 0,69	**CD x DP**	t = 1,436	p = 0,170
CE x Cx	t = 1,227	p = 0,237	**CE x Cx**	t = 1,385	p = 0,185
CE x DA	t = 1,733	p = 0,102	**CE x DA**	t = 1,435	p = 0,170
CE x DP	t = 0,4052	p = 0,69	**CE x DP**	t = 0,9544	p = 0,354

Gênero Masculino					
Fibras colágenas			**Fibras elásticas**		
CD x Cx	t = 1,584	p = 0,126	**CD x Cx**	t = 0,365	p = 0,717
CD x DA	U = 80	p = 0,837	**CD x DA**	U = 80	p = 0,837
CD x DP	t = 1,017	p = 0,319	**CD x DP**	U = 80	p = 0,737
CE x Cx	t = 1,790	p = 0,086	**CE x Cx**	U = 75	p = 0,644
CE x DA	U = 84	p = 1,00	**CE x DA**	U = 75	p = 0,744
CE x DP	t = 0,769	p = 0,449	**CE x DP**	t = 0,180	p = 0,858

Tabela 8: Associação das diferentes artérias analisadas quanto a porcentagem das fibras colágenas e fibras elásticas em relação ao sexo feminino e masculino.

Quando se analisa os pacientes sob as etnias branco e não branco, não houve diferença significativa em 100% dos brancos quanto as fibras colágenas e fibras elásticas e apenas diferença significativa de fibras colágenas entre a coronária circunflexa entre CE e CD dos pacientes não brancos. **Tabela 9.**

Brancos					
Fibras colágenas			**Fibras elásticas**		
CD x Cx	t = 1082	p = 0,288	CD x Cx	t = 2221	p = 0,054
CD x DA	t = 1824	p = 0,078	CD x DA	t = 1975	p = 0,052
CD x DP	U = 108	p = 0,426	CD x DP	t = 1853	p = 0,073
CE x Cx	t = 1168	p = 0,252	CE x Cx	U = 98	p = 0,266
CE x DA	t = 1924	p = 0,065	CE x DA	U = 108	p = 0,462
CE x DP	U = 104	p = 0,051	CE x DP	U = 103	p = 0,355

Não brancos					
Fibras colágenas			**Fibras elásticas**		
CD x Cx	t = 2,349	p = 0,04*	CD x Cx	t = 0,893	p = 0,392
CD x DA	t = 0,702	p = 0,498	CD x DA	t = 1,245	p = 0,241
CD x DP	t = 1,086	p = 0,303	CD x DP	t = 0,888	p = 0,394
CE x Cx	t = 2,275	p = 0,046*	CE x Cx	t = 0,939	p = 0,369
CE x DA	t = 0,603	p = 0,542	CE x DA	t = 1,288	p = 0,266
CE x DP	t = 1,369	p = 0,205	CE x DP	t = 0,934	p = 0,372

Tabela 9: Associação das diferentes artérias analisadas quanto (%) das fibras colágenas e fibras elásticas em relação à etnia.

7 I DISCUSSÃO

As doenças crônicas não transmissíveis tornaram-se uma preocupação mundial em que a doença aterosclerótica assim como outras doenças cardiovasculares são reconhecidas como destaque na morbimortalidade dos pacientes em geral, principalmente em pacientes idosos. Entretanto, merece destaque a incidência elevada dessas doenças em pacientes jovens, o que representa um grande impacto a saúde pública e privada em todo o mundo. A compreensão de sua fisiopatologia, progressão, fatores de risco e características clínicas associadas faz-se importante para um melhor manejo de prevenção e curativo dessa doença (SILVEIRA et al., 2016).

Estimativas populacionais apontam que em meados dos anos de 2025, o Brasil contará com 32 milhões de pessoas caracterizadas como idosas, o que representa cerca de 13% da população geral. Esse envelhecimento populacional demonstra a importância de estudos e políticas públicas no tratamento de doenças crônicas, como a aterosclerose, alterando não apenas o desfecho de morbimortalidade, mas como redução de gastos em saúde (IBGE, 2009).

O grande impacto que a cardiopatia isquêmica representa na vida da população faz com que milhares de artigos científicos sejam publicados anualmente com o intuito de compreender as mudanças na parede arterial que levam a formação da aterosclerose. Estudos de autópsias em neonatos apontam o aparecimento de estrias lipídicas em suas artérias, o que demonstra que a sua fisiopatologia inicia-se antes mesmo da exposição a inúmeros fatores de risco consagrados (NEUFELD et al., 1962; FERRAZ et al., 2016).

Diferentemente dos demais países do hemisfério ocidental, o Brasil apresenta uma maior mortalidade relacionada as doenças cerebrovasculares, comparando-se com as doenças arteriais coronarianas. Segundo dados do Ministério da Saúde publicados pela Sociedade Brasileira de Cardiologia, houve uma mortalidade de 52,5% (246.322 pacientes) em relação as doenças cerebrovasculares, e de 47,5% (222.852 pacientes) de doenças

coronarianas. Apesar de apresentarem fatores de risco semelhantes, essa diferença estatística apresenta grande impacto na saúde pública brasileira, visto que o acidente vascular encefálico representa a principal causa de invalidez temporária ou permanente, elevando tratamentos de alto custo e onerando os sistemas previdenciários público e privado (CESAR et al., 2014).

A associação da aterosclerose em diversos leitos arteriais é estudada em vários países devido à alta taxa de mortalidade cardiovascular, com elevado custo de gastos relacionados a saúde. No Japão, Nakamura et al (2017) realizaram um estudo em 121 pacientes autopsiados em que se buscou associação da doença arterial periférica assintomática com doenças cardiovasculares e aterosclerose em artérias carótidas, coronárias e renais. Ao se analisar de forma histopatológica, foram encontradas placas ateroscleróticas nas artérias ilíacas comum de graus avançados, de acordo com a AHA, em 72% de pacientes assintomáticos, com fatores de risco consagrados como hipertensão, diabetes mellitus e idade acima de 60 anos. Quanto à associação com outros leitos arteriais, encontraram 75% de pacientes com placas ateroscleróticas avançadas em coronárias, carótidas e ilíacas comum, com forte associação das lesões com doenças cardiovasculares, como infarto agudo do miocárdio, acidente vascular encefálico e doença renal (NAKAMURA et al., 2017)

Em um outro estudo realizado por Iwakiri et al (2014) buscou-se a associação das doenças vasculares renais e doença aterosclerótica sistêmica, em que se avaliaram 107 pacientes autopsiados através de alterações morfológicas das artérias renais e a espessura da camada íntima e média das artérias renais, cerebral, coronárias, carótidas e ilíacas comum. Através dessa mensuração de espessura, os autores concluíram que há forte associação entre as espessuras dos leitos arteriais, o que demonstra que pacientes com doença renal crônica possuem risco aumentado para doenças cardiovasculares. Isso pode ser confirmado com outro estudo realizado in vivo em que mais de 50% dos pacientes com doença renal crônica dialíticos apresentavam estenose significativa de artérias coronarianas (JOKI et al., 2009; OHTAKE et al., 2005).

De forma geral, ao analisar as fibras colágenas nesse estudo, foi possível verificar que não houve diferença significativa em relação as carótidas direita e carótidas esquerda com as coronárias descendente anterior e posterior, em que apresentam mensurações de campo de imagem (%) de fibras colágenas semelhantes nesses leitos arteriais. Estes achados corroboram com a literatura científica de que a aterogênese é um comprometimento crônico, de cunho sistêmico, em que há possibilidade de inflamação e início de formação de placas em diversos leitos arteriais do corpo humano simultaneamente. Em nosso estudo foi possível verificar uma diferença significativa entre as artérias carótidas direita e esquerda com a coronária circunflexa, onde houve maior predomínio de colágeno nas artérias carótidas. Isso pode ser explicado devido a redução de diâmetro e comprimento da artéria coronária circunflexa, em comparação às outras coronárias analisadas, com redução de

fluxo turbilhonar sanguíneo, em que pode haver menor lesão na camada íntima arterial. (SILVEIRA et al., 2017).

Um estudo revelou, que pacientes com quadro clínico de dor torácica devido a síndrome coronariana aguda apresentou-se com comprometimento da artéria descendente anterior em 44 a 56% dos casos, seguida em 27% a 39% pela coronária direita e 17% na artéria coronária circunflexa (SGARBOSSA, BIRNBAUM, PARRILLO, 2001).

As fibras colágenas constituem até 60% da proteína total da placa aterosclerótica, sendo constituídas principalmente por fibras do tipo 1 e fibras do tipo 3. As fibras do tipo 1 representam, aproximadamente, até dois terços da constituição colágena da placa, e as fibras do tipo 3 um terço. O aumento da matriz extracelular as custas de fibras colágenas levam não só ao aumento das camadas íntima e média da parede arterial, como depósitos para moléculas pró-aterogênicas, como fatores de crescimento e lipoproteínas modificadas, e a sinalização de macrófagos, células musculares lisas e estimulação da formação de trombos. Sabe-se que em lesões ateroscleróticas avançadas existem a presença de outros tipos de colágenos, como tipo 4 e 5. As fibras colágenas são essenciais tanto na formação da placa quanto na sua desestrutura funcional. O aumento exagerado leva a estenose arterial enquanto que uma produção deficiente qualitativamente e/ou quantitativamente pode levar a uma placa com risco de ruptura (REKHTER, 1999). Esse essa situação clínica é deletéria ao paciente em ambos os casos, em que o produto final pode ser o balanço negativo da oferta de oxigênio, levando a complicações cardiovasculares como infarto agudo do miocárdio e acidente vascular encefálico (MÜLLER, ZOTT, 2013).

Mudanças na estrutura das fibras colágenas em placas de aterosclerose de coronárias foi motivo de estudo em 68 pacientes que foram submetidos a bypass/enxerto coronariano devido a doença isquêmica do coração. Nesses pacientes, foi identificado acúmulo de lipídeos na camada de fibras colágenas, o que levou os autores a associar a presença de instabilidade de uma placa aterosclerótica ao aumento e a desestruturação das fibras colágenas da parede arterial (ZHDANOV et al., 2011).

Quanto às fibras elásticas, nosso estudo verificou que não houve diferença significativa entre todas as artérias carótidas e coronárias analisadas, o que mostra neoformação semelhante de fibras elásticas, com comprometimento em ambos os leitos arteriais. As fibras elásticas compõem aproximadamente metade da matriz extracelular, sendo a proteína com maior porcentagem na parede arterial. Produzidas pelas células musculares lisas, representam significativa importância na parede arterial, contribuindo com a tensão basal e com elevações reduzidas da tensão da parede arterial em alterações hemodinâmicas, antes que as fibras colágenas sejam envolvidas. Isso pode ser visto em nosso estudo, sendo que a porcentagem de fibras elásticas medida por campo representa-se maior que as fibras colágenas (WANG et al.,2017)

O desenvolvimento da aterosclerose acontece através da associação do acúmulo local de lipídeos e cálcio na placa aterosclerótica em formação. É proposto que haja

uma interação entre proteínas elásticas da parede arterial com as lipoproteínas de baixa densidade, o que leva a deposição lipídica. Estudos apontam que a deposição lipídica ocorre na placa aterosclerótica resultante de alterações qualitativas e quantitativas das fibras elásticas e colágenas. Esse remodelamento da parede arterial desequilibra a homeostase arterial, com migração de células musculares lisas e redução de defesa contra os ésteres de colesterol presentes (REKHTER, 1999).

Pacientes masculinos possuem maior fator de risco que femininos, antes do período do climatério, para o desenvolvimento de doença aterosclerótica. Apesar disso, nosso estudo demonstrou que a quantidade de fibras elásticas e colágenas em campo de imagem (%) seguiu-se de forma semelhante em ambos os gêneros, sem diferença significativa. Demonstra que os leitos arteriais seguem a mesma tendência de progressão da lesão crônica inflamatória, sem que haja, a princípio fator de influência do gênero nesse desenvolvimento patológico (REKHTER, 1999).

Há mais de cinquenta anos, os pesquisadores assumem uma associação entre as doenças arteriais periféricas e a doença arterial coronariana (HUR et al., 2012). Pacientes que apresentam lesões ateroscleróticas podem apresentá-las de formas sistêmicas em leitos coronarianos, carotídeos, femorais, ilíacos, renais entre outros. Existe um risco de complicações no pós-operatório de pacientes submetidos a doença arterial periférica, em decorrência de complicações cardiovasculares, o que aumenta significativamente a morbimortalidade. Hur et al (2012) relatam em seu trabalho que pacientes com doenças arteriais periféricas podem apresentar coronariopatias em 28% a 94% dos casos. Segundo os autores, essa ampla margem de diferença se deve as inúmeras classificações de estenose utilizadas pelos autores e pelos métodos diagnósticos utilizados. Em seus estudos, encontraram uma associação de doença arterial coronariana e doença em artérias carótidas em 72% dos pacientes (HUR et al., 2013).

Em um estudo realizado por Lobo et al (2015) para verificar os diferentes desfechos no período de pós-operatório de endarterectomia carotídea devido a aterosclerose acentuada em 737 pacientes, verificou-se que, aproximadamente, 30% dos pacientes que apresentaram indicação cirúrgica em carótidas, concomitantemente, apresentavam doença arterial coronariana. Ainda, verificou-se que em 30 dias houve uma mortalidade de 0,3% nesses pacientes com causa morte a síndrome coronariana aguda. Apesar de uma incidência relativamente baixa, as coexistências dessas doenças devem ser conhecidas pela equipe médica que presta assistência ao paciente, buscando alternativas e vigilância para complicações cardiovasculares (LOBO et al., 2015).

Um dos fatores limitantes do nosso estudo é o número reduzido de material para análise das artérias envolvidas nesse projeto, devido ao número decrescente de autopsias que vem sendo realizadas em nossa Instituição, porém que segue uma tendência mundial (HOYERT, 2011). Outra limitação que encontramos é em decorrência da *causa mortis* dos pacientes envolvidos, pois grande parte dos pacientes autopsiados em nossa Instituição

vieram ao óbito devido a patologias infecciosas e não cardiovasculares. Se obtivéssemos um maior número de solicitação de autópsias de pacientes cardiovasculares obteríamos resultados mais consistentes em relação à aterosclerose de pacientes com doenças cardiovasculares.

8 I CONCLUSÃO

A análise histopatológica de diferentes leitos arteriais de pacientes autopsiados apresentam a porcentagem de fibras colágenas e fibras elásticas semelhantes em grande parte das artérias carótidas e coronárias, o que sugere que ambos os leitos estão susceptíveis à formação aterosclerótica, o que pode desencadear a complicações de formação de placas avançadas com o decorrer do tempo e avançar da idade em pacientes expostos aos fatores estabelecidos.

REFERÊNCIAS

ABOYANS, V.; LACROIX, P. Indications for carotid screening in patients with coronary artery disease. **Presse Med**, v. 38, p. 977 – 986, 2009.

ASCHER, E. et al. Routine preoperative carotid duplex scanning in patients undergoing open heart surgery: is it worthwhile? **Ann Vasc Surg**, v. 15, p. 669 - 678, 2001.

BARONCINI, L. A. V.; SYLVESTRE, L. C.; PECOITS FILHO, R. Avaliação da espessura médio-intimal em crianças saudáveis entre 1 e 15 anos. **Arq Bras Cardiol**, v. 106, n. 4, p. 319 - 326, 2016.

BASSI, C. L.; GARCIA, R. F.; MIRANDA NETO, M. H. Espessamentos da íntima e sua relação com a aterosclerose em humanos. **Arq Ciênc Saúde Unipar**, v. 1, n. 1, p. 39 - 44, 1997.

BODARY, P. F.; EITZMAN, D. T. Vascular biology of atherosclerosis. In: Handler C., Cleman M. **Classic Papers in Coronary Angioplasty**. Springer, London, 2006.

BUITRAGO, C. G.; ARANGO, N. S.; BOLAND, R. L. 1α,25(OH)2D3-dependent modulation of Akt in proliferating and differentiating C2C12 skeletal muscle cells, **J. Cell. Biochem**, v. 113, p. 1170 - 1181, 2012.

CESAR, L. A. et al. Diretriz de Doença Coronária Estável. **Arq Bras Cardiol,** v. 103, p. 1 - 59, 2014.

CHUN, L. J. et al. Screening carotid artery duplex in patients undergoing cardiac surgery. **Ann Vasc Surg**, v. 28, p. 1178-85, 2014.

COSTACHE, M. et al. Clinical or Postmortem? The Importance of the Autopsy: a retrospective Study. **MAEDICA – a Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 3, p. 261 - 265, 2014.

DEITCH, J. S. et al. Cryptococcal aortitis presenting as a ruptured mycotic abdominal aortic aneurysm. **J Vasc Surg**, v. 30, n. 9, p. 189 - 92, 1999.

DURAND, D. J. et al. Mandatory versus selective preoperative carotid screening: a retrospective analysis. **Ann Thorac Surg**, v. 78, p. 159 - 66, 2004.

FERRAZ, M. L. F. et al. Morphometric evaluation of the aortic root in stillborns. **Pathology - Research and Practice**, v. 212, p. 686 – 689, 2016.

FIHN, S. D. et al. ACCF/AHA/ACP/AATS/PCNA/ SCAI/STS guideline for the diagnosis and management of patients with stable ischemic heart disease: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association task force on practice guidelines, and the American College of Physicians, American Association for Thoracic Surgery, Preventive Cardiovascular Nurses Association, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Thoracic Surgeons. **Circulation**, v. 126, p. 354 - 471, 2012.

GARDNER, E.; GRAY, D. J.; RAHILLY, R. O. Anatomia Estudo Regional do Corpo Humano. 4ª ed. Philadelphia, Guanabara Koogan, p. 679-680, 1999.

GOULD, L. A. et al. Cholesterol reduction yields clinical benefit: Impact of statin trials. **Circulation**, v. 97, p. 946 – 952, 1998.

HERON, M. Deaths: leading causes for 2010. **Natl Vital Stat***,* v. 62, p. 91–96, 2013.

HOBAIKA, A. B. S.; SEIBERLICH, E.; ISSA, M. R. N. Acute coronary syndrome in patient with severe coronary artery disease after laparoscopic cholecystectomy. **Br J Anaesth**, v. 57, n. 4, p. 406 - 409, 2007.

HOYERT, D.L. The changing profile of autopsied deaths in the United States, 1972 - 2007. **NCHS Data Brief**, v. 67, p. 1 - 8, 2011.

HUR, D. J. et al. Frequency of Coronary Artery Disease in Patients Undergoing Peripheral Artery Disease Surgery. **Am J Cardiol**, v. 110, n. 5, p. 736 – 740, 2012.

IGNOTZ, R. A.; MASSAGUÉ, J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. **Journal Biol Chem**, v. 9, p. 4337 - 45, 1986.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (IBGE). Indicadores Sociodemográficos e de Saúde no Brasil. **Estudos e Pesquisas**. Rio de Janeiro; 2009.

IWAKIRI, T. et al. Association between renal vasculature changes and generalized atherosclerotic: an autopsied survey. **Journal of Atherosclerosis and Trombosis**, v. 21, p. 99 - 107, 2014.

JASHARI, F. et al. Coronary and carotid atherosclerosis: similarities and differences. **Atherosclerosis**, v. 227 p. 193 - 200, 2013.

JOKI, N. et al. Effects of calcimimetic on vascular calcification and atherosclerosis in uremic mice. **Bone**, v. 45, p. 30 – 34, 2009.

KAZUM, S. et al. Prevalence of carotid artery disease among ambulatory patients with coronary artery disease. **IMAJ**, v. 18, p. 100 – 103, 2016.

KOSHI, G.; Cherian, K. M. Aspergillus terreus, an uncommon fungus causing aortic root abscess and pseudoaneurysm. **Indian Heart J**, v. 47, n. 3, p. 265 - 267, 1995.

LLOYD-JONES, D. et al. Heart disease and stroke statistics — 2010 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 121, p. 46 - 215, 2010.

LLOYD-JONES, D. M. et al. Lifetime risk of developing coronary heart disease. **Lancet**, v. 353, p. 89 – 92, 1999.

LOBO, M.; MOURAO, J.; AFONSO, G. Endarterectomia carotídea: revisão de 10 anos de prática de anestesia geral e locorregional num hospital terciário de Portugal. **Rev Bras Anestesiol**, v. 65, n. 4, p. 249 - 254, 2015.

MANSUR, A. P.; FAVARATO, D. Trends in Mortality Rate from Cardiovascular Disease in Brazil, 1980-2012. **Arq Bras Cardiol**, v. 107, n. 1, p. 20 – 25, 2016.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. Embriologia clínica 7ª edição .Rio de Janeiro, RJ. Editora Elsevier, Cap. O Sistema Cardiovascular, p. 395 - 396; pp 609, 2004.

MORTON, L. F.; BARNES, M. J. Collagen polymorphism in the normal and diseased blood vessel wall. Investigation of collagens types I, III and V. **Atherosclerosis**, v. 42, n. 1, p. 41 - 51, 1982.

MULLER, K. ZOTT, M. Diagnostico de isquemia e infarto perioperatorio. **Rev Chil Anest**, v. 42, n. 1, p. 48 – 54, 2013.

NAKAMURA, E. et al. Asymptomatic plaques of lower peripheral arteries and their association with cardiovascular disease: an autopsy study. **Journal of Atherosclerosis and Trombosis**, v. 24, p. 1 - 7, 2017.

NAPOLI, C.; PIGNALOSA, O.; NIGIRIS, F. Childhood infection and endothelial dysfunction: a potential link in atherosclerosis? **J American Heart Association**, v. 111, p. 1568 - 70, 2007.

NARDIN, M. et al. Vitamin D status, diabetes mellitus and coronary artery disease in patients undergoing coronary angiography. **Atherosclerosis**, v. 250, p. 114 – 121, 2016.

NASCIMENTO, B. R. et al. Global health and cardiovascular disease. **Heart**, v. 100, p. 1743 – 49, 2014.

NEUFELD, H. N.; WAGENWOORT, C.A.; EDWARDS, J.E. - Coronary arteries in fetuses, infants, juveniles and young adults. **Lab Invest**, v. 11, p. 837 - 42, 1962.

NEVES, J. A.; NEVES, J. A.; OLIVEIRA, R. C. M. Biomarkers of endothelial function in cardiovascular diseases: hypertension. **J Vasc Bras**, v. 15, n. 3, p. 223 – 24, 2016.

OHTAKE, T. et al. High prevalence of occult coronary artery stenosis in patients with chronic kidney disease at the initiation of renal replacement therapy: an angiographic examination. **J Am Soc Nephrol**, v. 16, p. 1141 – 8, 2005.

O'LEARY, D. H. et al. Carotid artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. **N Engl J Med**, v. 340, n. 1, p. 14 - 22, 1999.

QUERFELD, U. Vitamin D and inflammation. **Pediatr. Nephrol**, v. 28, p. 605 – 610, 2013.

RAU, P. et al. Coronary calcium assessment with computed tomography in HIV-infected patients. **Atherosclerosis**, v. 249, p. 99 - 100, 2016.

REKHTER, M. D. Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough. **Cardiovascular research**, v. 41, p. 376 – 384, 1999.

ROBBINS S. L. et al. Patologia – Bases patológicas das doenças. 7º Edição. Rio de Janeiro, RJ. Editora Elsevier, 2004.

ROGER, V. L. et al. Heart disease and stroke statistics - 2011 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 123, n. 4, p. 18 – 20, 2011.

ROSENFELD, M. E.; CAMPBELL, L. A. Pathogens and atherosclerosis: update on the potential contribution of multiple infectious organisms to the pathogenesis of atherosclerosis. **Thromb. Haemost**, v. 106, p. 858 - 867, 2011.

SANTOS-GALLEGO, C. G.; PICATOSTE, B.; BADIMÓM, J. J. Pathophysiology of acute coronary syndrome. **Curr Atheroscler Rep**, v. 16, p. 401, 2014.

SGARBOSSA, E.; BIRNBAUM, Y.; PARRILLO, J. E. Electrocardiographic diagnosis of acute myocardial infarction: Current concepts for the clinician. **Am Heart J**, v. 141, p. 507 - 17, 2001.

SHINTAKU, M. et al. Aortic lesions in aspergillosis: histopathological study of two autopsy cases. **Virchows Arch**, v. 439, p. 640 - 4, 2001.

SILVEIRA, E. A. et al. Obesity and its Association with Food Consumption, Diabetes Mellitus, and Acute Myocardial Infarction in the Elderly. **Arq Bras Cardiol**, v. 107, n. 6, p. 509 - 517, 2016.

SILVEIRA, L. A. M. et al. Implications of systemic fungal infection in the atherosclerosis of autopsied patients. **J Health Sci Inst**, v. 31, n. 2, p. 141-3, 2013.

SIMÃO, A. F. et al. I Diretriz Brasileira de prevenção cardiovascular. **Arq Bras Cardiol**, v. 101, n. 6, p. 1 - 63, 2013.

STARY, H. C. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: An Update. **Arterioscler Tromb Vasc Biol**, v. 20, p. 1177 - 78, 2000.

STEINVIL, A. et al. Prevalence and predictors of concomitante carotid and coronary artery atherosclerotic disease. **J Am Coll Cardiol**, v. 57, p. 779 - 83, 2011.

STRONG, J. P. Atherosclerotic lesions. Natural history, risk factors, and topography. **Arch Pathol Lab Med**, v. 116, n. 12, p. 1268 – 75, 1992.

TABARA. Y. et al. The causal effects of alcohol on lipoprotein subfraction and triglyceride levels using a Mendelian randomization analysis: The Nagahama study. **Atherosclerosis**, v. 257, p. 22 – 28, 2017.

TALARICO, G. P. et al. Cocaine and coronary artery diseases: a systematic review of the literature. **J Cardiovasc Med**, v. 18, n. 5, p. 291 - 294, 2017.

TENDERA, M. et al. Reduction of Atherothrombosis for Continued Health Registry Investigators. Three-year follow-up and event rates in the international reduction of Atherothrombosis for Continued Health Registry. ESC guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases: document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries: the Task Force on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Artery Diseases of the European Society of Cardiology (ESC). **Eur Heart J**, v. 32, n. 22, p. 2851 – 2906, 2011.

TOUBOUL, P. J. et al. Correlation between the Framingham risk score and intima media thickness: the Paroi Arterielle et Risque Cardio-vasculaire (PARC) study. **Atherosclerosis**, v. 192, n. 2, p. 363, 2007.

VAN DAM, A. D. et al. BCG lowers plasma cholesterol levels and delas atherosclerotic lesion progression in mice. **Atherosclerosis**, v. 251, p. 6 – 14, 2016.

WANAMAKER, K. M. et al. Contemporary incidence and risk factors for carotid artery disease in patients referred for coronary artery bypass surgery. **J Cardiothorac Surg**, v. 7, p. 78 - 82, 2012.

WANG, D. et al. Roles of Cells from the Arterial Vessel Wall in Atherosclerosis. **Mediator Inflamm**, 2017:8135934, 2017.

WESTERTERP, M. et al. Apolipoprotein C-I is crucially involved in lipopolysaccharide-induced atherosclerosis development in apolipoprotein E-knockout mice. **Circulation**, v. 116, p. 2173 – 81, 2007.

WILLIAMS, M. A. Quantitative methods in biology. In: Pratical methods in electron microscopy. Editted by Glaubert A. M. Elsevier North-Holland Biomedical Press. Amsterdam, The Nederlands, p. 233, 1977.

YAHAGI, K. et al. Pathophysiology of native coronary, vein graft, and in-stent atherosclerosis. **Nat Rev Cardiol**, v. 13, n. 2, p. 79 – 78, 2016.

ZHDANOV, V. S. et al. Collagen fiber pathology in atherosclerotic plaques of the coronary arteries in ischemic heart disease. **Arkh Patol**, v. 73, n. 6, p. 3 – 6, 2011.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA DISTÂNCIA GENÉTICA ENTRE POPULAÇÕES DE *Bursaphelenchus cocophilus*

Data de aceite: 26/05/2021
Data de submissão: 17/03/2021

Arinaldo Pereira da Silva
Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Instituto de Estudos do Xingu
São Félix do Xingu – Pará
http://lattes.cnpq.br/1567167598725634

Josineide Rodrigues da Costa
Faculdade de Venda Nova do Imigrante
Venda Nova do Imigrante – ES
http://lattes.cnpq.br/1576839246612075

RESUMO: O fitonematoide *Bursaphelenchus cocophilus* tem grande importância nos cultivos de Coqueiro e Dendezeiro, por causar a doença Anel-vermelho do coqueiro. Atualmente, há apenas 19 registros sequências de DNA deste fitonematoide no GenBank, de populações oriundas do Brasil, Colômbia, Costa Rica e Honduras. O objetivo deste trabalho foi analisar a similaridade das sequências de DNA da região 28s de *B. cocophilus*, depositadas no GenBank. Foram utilizadas as 19 sequencias de DNA da região D2/D3 da região 28s do DNA mitocondrial, depositadas no GenBank. As sequências foram avaliadas no NCBI/BLAST, realizando-se o alinhamento múltiplo, e a seguir foi calculada a distância genética no programa MEGA X. A matriz de similaridade obtida neste estudo mostrou que há um baixo nível de divergência genética entre as populações de *B. cocophilus* da América Latina, indicam que há baixo fluxo genético entre as populações.

PALAVRAS-CHAVE: Anel vermelho, Fitonematoide, região 28s.

EVALUATION OF THE GENETIC DISTANCE AMONG POPULATIONS OF *Bursaphelenchus cocophilus*

ABSTRACT: The nematode *Bursaphelenchus cocophilus* presents great importance in the coconut and oil palm cultivation as it causes the red ring disease of coconuts. Currently, there are only 19 DNA sequences records of this nematode in the GenBank of populations from Brazil, Colombia, Costa Rica and Honduras. The objective of this work was to analyze the DNA sequences similarity of 28s region of *B. cocophilus* deposited in GenBank. 19 DNA sequences of the D2 / D3 region of the 28s mitochondrial DNA region were used, deposited in the GenBank. The sequences were evaluated in NCBI / BLAST, performing the multiple alignment and then the genetic distance was calculated using MEGA X program. The matrix of similarity obtained in this study showed that there is a low level of genetic divergence among populations of *B. cocophilus* in Latin America, indicating that there is a low genetic flow among the populations.

KEYWORDS: Red ring disease, plant parasitic nematodes, 28s region.

INTRODUÇÃO

O anel-vermelho é considerado uma doença letal para as plantas infectadas, tem como agente etiológico o fitonematoide *Bursaphelenhus cocophilus* (Cobb) Baujard

(WARWICK; LEAL, 2003). Sua distribuição ocorre em muitos países americanos, como Belize, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guiana Francesa, Granada, Guatemala, Guiana, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Peru, São Vicente e Granadinas, Suriname, Trinidade e Tobago e Venezuela (FAO, 2011).

Os hospedeiros de *B. cocophilus* são restritos a espécies da família Arecaceae (Palmae), já tendo sido relatadas 17 espécies suscetíveis. Contudo, apenas nas plantas de coqueiros, dendezeiro e tamareira (*Phoenix dactylifera*), os danos têm importância econômica (MOENS; PERRY, 2009). A doença anel-vermelho tem sido responsável por grandes perdas nas culturas de coco, de dendê e de outras palmáceas hospedeiras (GRIFFITH; KOSHY, 1990). Em áreas de cultivos de coco e de dendê já bem estabelecidos, *B. cocophilus* é considerado o mais importante fitonematoide (BRAMMER; CROW, 2001).

Pouco se sabe sobre as informações genéticas de *B. cocophilus*, diferente das demais espécies do gênero *Bursaphelenchus*, este fitoparasita não se alimenta de fungo, em parte do seu ciclo de vida. (GIBLIN-DAVIS; GERBER; GRIFFITH, 1989). Essa especialização pode estar relacionada a planta hospedeira, sabe-se que plantas exercem uma forte seleção natural que pode gerar diferenciação genética e até mesmo isolamento reprodutivo, nos seus parasitas (BETHENOD et al., 2005; FUNK, 2010).

A incorporação de informações de ecologia evolutiva nas práticas de manejo de pragas não só enriquecerá nossa compreensão dos processos genéticos populacionais em escala local, mas também ajudará na formulação de estratégias de manejo de pragas de forma mais eficientes e sustentável do que as práticas atualmente realizadas (BARMAN et al., 2012).

Objetivou-se neste trabalho avaliar a similaridade e distância genética entre as populações de *B. cocophilus* do Brasil e da Colômbia, usando a região 28s do DNA ribossomal.

METODOLOGIA

Foram utilizadas as 19 sequências da região 28s do dna ribossomal, disponíveis para *B. cocophilus*. As sequências foram avaliadas no NCBI/BLAST, realizando-se o alinhamento múltiplo (Muscle), e calculada a distância genética no programa MEGA X (KUMAR et al., 2018) e foi gerada uma matrix de distância genética usando distâncias não corrigidas (distânciap), com base em sequências da região D2/D3 da região do 28s. A matriz de distância não foi calculada usando um modelo de evolução, devido já ter sido demonstrado que o cálculo e uso de p-distância impossibilita a parametrização excessiva e não há necessidade de usar medidas de distâncias complexas ao estudar sequências (NEI; KUMAR, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O alinhamento de sequências parciais do gene 28s do rDNA produziram fragmento de comprimento de 631 bp, dos quais 10 são variáveis e quatro são parcimoniosos informativos, e 621 são conservados. Foi observado, figura 1, um baixo índice de distância genética, variando entre 0,000 e 0,011, entre as populações avaliadas. A máxima distância genética foi obtida entre a população de Honduras (AY508076) e Colômbia (KT156778). Entre as populações brasileiras apenas uma população, KT156772 apresentou diferença das demais (0,002). Nas primeiras sequências depositadas para as populações da Colômbia (GenBank acesso iniciado com KT) foi observado maior diversidade entre as mesmas (0,000 a 0,003).

População	Brasil						Colômbia							Costa Rica	Honduras	Colômbia			
	771	770	769	774	773	772	778	775	776	777	781	779	780	76	77	643	642	641	640
KT156771 BRA	-																		
KT156770 BRA	0,000	-																	
KT156769 BRA	0,000	0,000	-																
KT156774 BRA	0,000	0,000	0,000	-															
KT156773 BRA	0,000	0,000	0,000	0,000	-														
KT156772 BRA	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	-													
KT156778 CO	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,008	-												
KT156775 CO	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,002	0,006	-											
KT156776 CO	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,002	0,006	0,000	-										
KT156777 CO	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,003	0,008	0,002	0,002	-									
KT156781 CO	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,005	0,010	0,003	0,003	0,002	-								
KT156779 CO	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,002	0,006	0,000	0,000	0,002	0,003	-							
KT156780 CO	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,005	0,010	0,003	0,003	0,002	0,000	0,003	-						
AY508076 CR	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000	0,008	0,002	0,002	0,003	0,005	0,002	0,005	-					
AY508077 Hon	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,003	0,011	0,005	0,005	0,006	0,008	0,005	0,008	0,003	-				
MN612643 CO	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000	0,008	0,002	0,002	0,003	0,005	0,002	0,005	0,000	0,003	-			
MN612642 CO	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000	0,008	0,002	0,002	0,003	0,005	0,002	0,005	0,000	0,003	0,000	-		
MN612641 CO	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000	0,008	0,002	0,002	0,003	0,005	0,002	0,005	0,000	0,003	0,000	0,000	-	
MN612640 CO	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000	0,008	0,002	0,002	0,003	0,005	0,002	0,005	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	-

Tabela1: Distância genética entre populações da America Latina de *Bursaphelenchus cocophilus*, baseada na região 28s do DNA ribossomal.

Com os novos depósitos no GenBank de sequências de populações da Colômbia (GenBank acesso iniciado com MN) foi possível observar que estas e as sequências colombianas anteriores apresentam mais diversidade genética (0,002 a 0,005), essa baixa diversidade genética pode estar ocorrendo por causa dos efeitos da endogamia devido às suas populações pequenas e isoladas, bem como à capacidade de dispersão limitada do nematoide (Tabela 1). Até o momento há poucas sequências da região D2/3 do gene 28s de populações de *Bursaphelenchus cocophilus*, uma de Honduras, uma da Costa Rica, seis do Brasil e 11 da Colômbia (YE et al., 2007; SILVA et al., 2016).

A distância genética antes observada entre a população de *B. cocophilus* da Costa

Rica (AY508076) e Colômbia (KT), variando entre 0,002 a 0,008 (SILVA et al., 2016) não foi observada com as novas populações Colombianas (MN), analisadas neste trabalho. A população de Honduras (AY508077) continua sendo a população que mais apresenta distância genética das demais populações conhecidas, variando 0,03 a 0,011. Estudos similares foram desenvolvidos com *B. xylophilus*, também usando a região D2/3, oriundos da China, Japão e Estados Unidos, e não foi encontra diversidade genética entre as populações ou entre subpopulações, onde os autores concluíram haver um único grupo chamado CPJU, havendo apenas uma diferenciação deste grupo com a população do Canadá (ZHANG et al., 2008). Para *B. xylophilus*, tem se encontrado maior variabilidade genética, 0.144 a 0.916, quando são usados genes mitocôndriais (ZHANG et al., 2018).

A diferenciação genética entre as populações é afetada por mutação, migração, deriva e seleção (WHITLOCK, 2011). Outros fatores extrínsecos (por exemplo, heterogeneidade de habitat) e fatores intrínsecos (por exemplo, capacidade de dispersão, sistema de acasalamento e preferência de habitat) têm um impacto no pool genético em nível intrapopulacional (BEZAULT et al., 2011).

A adaptabilidade de uma espécie às mudanças ambientais depende muito da diversidade genética e da estrutura genética de suas populações (ZU et al. 1999), sendo esta diversidade genética mantida nas populações em correlação a eventos históricos e de processos evolutivos recentes (LEE et al. 2002).

CONCLUSÕES

Este estudo mostrou baixos níveis de divergência genética entre as populações de *Bursaphelenchus cocophilus* da América Latina, indicam que há baixo fluxo genético entre as populações, devido provavelmente a barreiras geográficas.

REFERÊNCIAS

BARMAN, A. K., M. N. et al. **Geographic pattern of host-associated differentiation in the cotton fleahopper, *Pseudatomoscelis seriatus*.** Entomol. Exp. Appl. v.143, p.31–41, 2012.

BETHENOD, M.T. et al. **Genetic isolation between two sympatric host plant races of the European corn borer, Ostrinia nubilalis Hubner. II: assortative mating and host-plant preferences for oviposition**. Heredity. v.94, p. 264–270, 2005.

BEZAULT, E. et al. **Spatial and temporal variation in population genetic structure of wild Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) across Africa**. BMC Genet. 12:102, 2011.

BRAMMER, A. S.; CROW, W. T. **Red ring nematode, *Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb) Baujard (Nematoda: Secernentea: Tylenchida: Aphelenchina: Aphelenchoidea: Bursaphelenchina) formerly *Rhadinaphelenchus cocophilus*.** EENY-236, Entomology and Nematology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, p.1-4, 2001.

CAO, A. X. et al. **Detection of the Pinewood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, Using a Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay.** Phytopathology. v. 95, n. 5, p.566-71, 2005.

CARDOSO, J. M.; FONSECA, L.; ABRANTES, I. **Genetic diversity of ITS sequences of *Bursaphelenchus xylophilus*.** Genet Mol Res, v.11, n. 4, p. 4508-15, 2012.

FAO FORESTRY PAPER164. **Guide to implementation of phytosanitary standards in forestry**, p. 111, 2011.

FOULY, H.; WILKINSON, H. T.; CHEN, W. **Restriction analysis of internal transcribed spacers and the small subunit gene of ribossomal DNA among four Gaeumannomyces species**. Mycologia, v. 89, p.590-598, 1997.

FUNK, D. J. **Does strong selection promote host specialisation and ecological speciation in insect herbivores? Evidence from Neochlamisus leaf beetles.** Ecological Entomology, v.35, p. 41–53, 2010.

GIBLIN-DAVIS, R.M. Insects of borers. In: HOWARD, F. W.; MOORE, D.; GIBLIN-DAVIS, R.M.; ABAD, R.G. **Insects on palms**. Wallingford-Oxon: CABI Publishing, 2001. 414p.

GIBLIN-DAVIS, R.M.; GERBE, R. K.; GRIFFITH, R. *In vivo* and *in vitro* culture of the red ring nematode, *Rhadinaphelenchus cocophilus*. Nematropica. v.19, p.135–142, 1989.

GRIFFITH, R.; KOSHY, P.K. **Nematode parasites of coconut and other palms.** In: Luc, M., Sikora, R.A. & Bridge, J. (Eds). Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. Wallingford, UK, CABI Publishing. 1990. p. 363-386.

HU, Y. Q. et al. **Direct PCR-based method for detecting *Bursaphelenchus xylophilus*, the pine wood nematode in wood tissue of Pinus massoniana**. Forest Pathology. v.41, p. 165–168, 2011.

JONES, J. T. et al. ***Bursaphelenchus xylophilus*: opportunities in comparative genomics and molecular host–parasite interactions.** Molecular Plant Pathology, v. 9, n. 3, p.357-68, 2008.

KUMAR, S. et al. **MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms**. Mol Biol Evol. v. 1, n. 35, p.1547-1549, 2018.

LEE, S. L. et al. **Population genetics of *Intsia palembanica* (Leguminosae) and genetic conservation of *Virgin Jungle* Reserves in Peninsular Malaysia.** Am. J. Bot. v. 89, p.447-459, 2002.

MOENS, M.; PERRY, R. N. **Migratory plant endoparasitic nematodes: A group rich in contrasts and divergence**. Annual Review of Phytopathology, v. 47, p. 313-332, 2009.

MOTA, M. M. et al**. First report of *Bursaphelenchus xylophilus* Portugal and in Europe.** Nematology, v. 1, n. 7-8, p. 727-734, 1999.

NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. New York: Oxford University Press; 2000.

RUTHERFORD, T.A.; MAMIYA, Y.; WEBSTER, J. M. **Nematode-induced pine wilt disease: factors influencing its occurrence and distribution**. Forest Science. v. 36, n.1, p. 145-155, 1990.

RYSS, A. et al. **A synopsis of the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Aphelenchida: Parasitaphelenchidae) with keys to species.** Nematology, v. 7, n. 3, p. 393-458, 2005.

SILVA, A. P. et al. **Genetic diversity of *Bursaphelenchus cocophilus* in South America**, Nematology, Leiden, p. 1-10, abr. 2016.

SLATKIN, M. **Gene flow and population structure**. In Real LA (Ed) Ecological Genetics. Princeton University Press, Princeton. 1994.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. Jaboticabal, FUNEP, 1993. 372 p.

WARWICK, D. R. N.; LEAL, E. C. Principais doenças letais In: FERREIRA, J.M.S., (ed.). **Coco Fitossanidade**. Brasília-DF, EMBRAPA, p.51-62, 2003.

WHITLOCK, M. C. **G'ST and D do not replace FST**. Mol. Ecol. v.20, n. 6, p.1083-1091, 2011.

YE, W. et al. **Phylogenetic relationships among *Bursaphelenchus* species (Nematoda: Parasitaphelenchidae) inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequence data.** Molecular Phylogenetics and Evolution, v. 43, n. 3, p. 1185-97, 2007.

YE, W.; GIBLIN-DAVIS, R. M. **Molecular Characterization and Development of Real-Time PCR Assay for Pine-Wood Nematode *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae).** PLOS One. DOI: 10.1371/journal.pone.0078804. 2013

ZHANG, H. et al. High Mitochondrial Genome Diversity and Intricate Population Structure of *Bursaphelenchus xylophilus* in Kyushu, Japan. **Journal of nematology**, v. 50, n. 3, p. 281–302, 2018.

ZHANG, K. et al. **Molecular Phylogeny of Geographical Isolates of *Bursaphelenchus xylophilus*: Implications on the Origin and Spread of this Species in China and Worldwide**. Journal of nematology, v. 40, n.2, p. 127–137, 2008.

ZHAO, B. G. et al. **Distribution and pathogenicity of bacteria species carried by *Bursaphelenchus xylophilus* in China**. Nematology, v. 5, n. 6, p.899-906, 2003.

ZHUO, K. et al. **A multiplex one-step PCR method for the simultaneous identification of *Bursaphelenchus xylophilus*, *B. mucronatus* and *B. doui* –three species within the xylophilus group**. Forest Pathology, v. 41, n. 1, p. 66-69, 2011.

ZU, Y. G.; SUN, M.; KANG, L. **The theory, method, and application of molecular ecology**. Higher Education Press, Beijing, China. p. 30–37, 1999.

CAPÍTULO 4

AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA CICATRIZAÇÃO DE PELE DE RATOS WISTAR TRATADOS COM POMADA DE EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE PERESKIA ACULEATA MILLER (ORA – PRO- NÓBIS)

Data de aceite: 26/05/2021

Ana Rosa Crisci
http://lattes.cnpq.br/5780770064633516

Cauê Aparecido de Jesus Cavé Lima
http://lattes.cnpq.br/2973056377550434

Rosilene Alves Rodrigues
http://lattes.cnpq.br/4378772252280580

Vanessa Digilio Vanzo
http://lattes.cnpq.br/0082711919834948

Jose Norberto Bazon
http://lattes.cnpq.br/1477289078926701

Wilson Roberto Malfará
http://lattes.cnpq.br/1349279406406034

Lucila Costa Zini Angelotti
http://lattes.cnpq.br/8754211273865269

RESUMO: Plantas medicinais são usadas na saúde humana desde tempos pré-históricos, e, atualmente, pesquisas científicas são realizadas nessa área, embora as investigações para algumas espécies seja escassa ou até mesmo ausente. Ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller, Cactaceae) é uma planta utilizada na alimentação humana em algumas regiões do Brasil e que tem despertado interesse recentemente pelo seu potencial uso medicinal, principalmente pela sua atuação como cicatrizante. O presente trabalho visa contribuir para a investigação do potencial cicatrizante da planta em feridas cutâneas, uma vez que há poucos trabalhos sobre suas atividades biológicas e qualquer método que auxilie no processo cicatricial será benéfico para a saúde, estética e consequentemente para a sociedade. Para tal investigação, aplicou-se pomada a 10% feita do extrato etanólico concentrado de ora-pro-nóbis em feridas dorsais de um grupo de ratos e comparou-se a evolução cicatricial deste com outros três grupos que receberam tratamentos diferentes (soro fisiológico a 0,9%, pomada sem princípio ativo – somente veículo - e Dersani®). As feridas de todos os ratos foram analisadas macro e microscopicamente e os dados coletados foram examinados estatisticamente pelo teste paramétrico da Anova, para comparação dos grupos. Concluiu-se que a pomada de ora-pro-nóbis apresentou resultados relevantes quanto à formação de crostas em relação aos outros tratamentos, nos estágios iniciais do processo cicatricial. Também mostrou-se um tratamento melhor do que o soro fisiológico a 0,9%, não sendo, entretanto efetiva na regeneração epitelial das feridas, nem apresentou resultados conclusivos quanto às outras comparações.

PALAVRAS-CHAVE: Cicatrização cutânea. Extrato etanólico. *Pereskia aculeata* Miller.

ABSTRACT: Medicinal plants have been used in human healthy since pre-historical times, and, at present, scientific research projects have been carried out at this field, although the studies for some species is little or even absent. Ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller, Cactaceae) is a plant widely used for human feeding in some Brazil's regions and that has recently aroused interest because of its potential medicinal application, mainly for its performance as a

wound healing agent. The present assignment aims to contribute toward the research on the cutaneous wound healing potential of ora-pro-nóbis, since there are few studies about its biological activities and that any method which assists in the healing process will be beneficial for the health and aesthetic of people affected by wounds of different seriousness levels, and, consequently, for the whole society. For such research, it was applied ointment 10% made of the concentrated ethanolic extract of the leaves of ora-pro-nóbis on dorsal wounds of a group of rats and it was compared the healing evolution of that one with other three groups which received different treatments (saline 0,9%, ointment with no active ingredient – only vehicle - and Dersani®). All the rats' wounds were analyzed macro and microscopically and the collected data were examined statistically by using the parametric test of ANOVA, in order to compare the groups. It was concluded the ora-pro-nóbis ointment showed relevant results as to the formation of scab in relation to the other treatments, at the initial stages of the healing process. It also showed to be a better treatment than saline 0,9%, not being, however, effective about the epithelial regeneration of the wounds, nor did it show conclusive results as to other comparisons.
KEYWORDS: Cutaneous healing. Ethanolic extract. *Pereskia aculeata* Miller.

1 I INTRODUÇÃO

A origem do uso de produtos naturais pelo homem perde-se no tempo, uma vez que estando em contato direto com o ambiente natural os primeiros seres humanos aprenderam a fazer uso do que os cercava a fim de melhorar a vida cotidiana, inclusive sua saúde. Com o surgimento da escrita iniciou-se o registro desses usos. Documentos antigos, como o Papiro Ebers, datado de cerca de 1500 a.C., no Antigo Egito, mostram como eram feitos os tratamentos médicos em épocas em que não havia medicamentos sintéticos nem mesmo equipamentos avançados de diagnóstico ou cirurgia. Outras civilizações antigas, além dos egípcios, também deixaram registros de como era sua Medicina: tábuas mesopotâmicas, textos tradicionais chineses, textos hindus (Ayurveda), entre outros (EVANS, 2009).

Textos medievais e modernos também relatam usos de produtos naturais para o tratamento de doenças. Na Idade Média surgem os boticários, com vasto catálogo de produtos naturais e seus respectivos usos no tratamento de doenças e injúrias diversas. Até então, os produtos naturais eram o único meio que as pessoas dispunham para tratar problemas de saúde, muitas vezes aliados à crenças e práticas místicas e religiosas (MENEZES, 2005).

A produção em escala industrial de novas substâncias farmacêuticas nunca antes observadas na natureza, a partir do século XIX, abriu novas possibilidades, tirando o foco dos produtos naturais, entretanto a pesquisa nessa área nunca parou e, recentemente, tem havido crescente interesse nesse campo de pesquisa uma vez que os avanços tecno-científicos permitem analisar os produtos naturais num nível jamais observado antes, tornando a Fitoterapia, a Fitoquímica e a Farmacognosia áreas de intensas descobertas de princípios ativos farmacológicos, o que amplia a lista de substâncias com uso medicinal. As

pesquisas também visam encontrar as melhores formas de utilização medicinal de certas espécies vegetais, expondo seus benefícios e malefícios, algumas das quais já são muito bem conhecidas em certas comunidades. Além do mais, muitas doenças ainda estão sendo investigadas quanto aos mecanismos que as causam, e a descoberta de novas substâncias com propriedades farmacológicas pode revelar algum fármaco útil para o tratamento de algumas delas (EVANS, 2009; DEWICK, 2009).

A ação farmacológica de espécies vegetais reside, na maioria das vezes, em substâncias chamadas metabólitos secundários, definidas como substâncias de distribuição mais restrita em comparação aos metabólitos primários (proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos). Alcaloides, terpenoides, glicosídeos, flavonoides e fenilpropanoides são alguns exemplos de metabólitos secundários encontrados nas plantas. Entretanto, a divisão entre metabólitos primários e secundários nem sempre é tão óbvia e algumas sobreposições são descritas na literatura, a exemplo de alguns esteroides (tipo de lipídio) com ação farmacológica, mas de distribuição restrita (DEWICK, 2009).

Na procura de novas substâncias com propriedades medicinais, uma planta que vem despertando interesse é a ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller), um membro da família Cactaceae, trepadeira, armada, com folhas suculentas e mucilaginosas e que pode atingir até 10 metros de altura, encontrada em toda a América tropical (TELLES et al., 2017). Análises fitoquímicas feitas em seus diferentes órgãos (principalmente nas folhas), já revelaram a presença de várias classes de metabólitos secundários: flavonoides, terpenoides, fitoesteróides, entre outros (PINTO et. al, 2012; PINTO et al., 2015; SOUZA et al., 2016). Classes essas cujos efeitos fisiológicos e farmacêuticos já vêm sendo estudados intensamente para várias plantas, mas que para a ora-pro-nóbis ainda não há uma quantidade considerável de trabalhos publicados ou mesmo citações em livros de referência na área. As análises também indicam que extratos alcoólicos de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) são ricos em polifenóis, substâncias conhecidas por seu efeito antioxidante e que podem diminuir os efeitos do processo inflamatório pela diminuição do estresse oxidativo, isso sem apresentar efeitos citotóxicos às células vitais para o processo de cicatrização (CARVALHO et al., 2014).

O presente trabalho busca verificar o potencial dessa planta como agente cicatrizante de feridas cutâneas em ratos (*Rattus norvegicus*) machos adultos da linhagem Wistar por meio da utilização de pomada na concentração de 10% feita a partir das folhas da planta. Objetiva-se, especificamente, analisar e comparar macro e microscopicamente a evolução do processo cicatricial para cada grupo, investigando tanto a redução progressiva das áreas das feridas quanto os elementos citológicos e histológicos que surgirem.

As lesões cutâneas ocorrem no cotidiano das pessoas, nas mais variadas extensões e gravidades. Lesões hospitalares também são muito comuns, como as úlceras por pressão, que são lesões profundas, graves e de difícil tratamento causadas por pressão ou cisalhamento e que afetam pessoas acamadas e/ou com déficit motor/cognitivo

(NOGUEIRA *et al*., 2012). Desta maneira, é imprescindível que pesquisas busquem novas técnicas e intervenções a fim de minimizar ou abreviar o tempo do processo cicatricial, de forma que a pele possa ter de volta sua integridade para exercer suas funções, bem como atuar contra possíveis danos estéticos às pessoas. Sendo assim, qualquer substância ou método que vise melhorar tais condições é de fundamental importância no bem-estar de uma população.

A validação científica do uso medicinal de espécies vegetais pode encorajar o uso mais abrangente, tornando os fitomedicamentos de tais fontes uma alternativa à medicamentos mais caros, especialmente em países onde os serviços de suporte à saúde são precários (EVANS, 2009). A ora-pro-nóbis, por exemplo, já é usada pelas populações locais como emoliente de feridas, cicatrizante em casos de queimaduras e para abrandar os sinais do processo inflamatório, entretanto, o interesse científico pelas propriedades medicinais da ora-pro-nóbis é muito recente e ainda há pouco material publicado sobre suas atividades biológicas (PINTO et al., 2010; SOUZA et al., 2016), visto isso, faz-se necessária mais investigações sobre a amplitude de uso desta planta. Portanto, este trabalho visa, também, contribuir com as pesquisas já feitas sobre o poder cicatrizante da planta e, também, servir de base para estudos futuros.

2 I MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Procedimento cirúrgico e Tratamento das feridas

Todos os procedimentos com os animais foram desenvolvidos no Biotério do Centro Universitário Barão de Mauá, após a aprovação do CEPAN (Comitê de Ética Animal) (nº 362/19).

O preparo do extrato etanólico ocorreu no Laboratório de Química e Bioquímica II, do Centro Universitário Barão de Mauá.

Utilizou-se para a pesquisa ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar), pois são animais cuja biologia é muito bem conhecida e por serem de fácil manutenção e manuseio devido ao pequeno porte, fácil alimentação e rápida reprodução.

Os animais foram anestesiados por via intramuscular com cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina, na região da coxa. Em seguida realizou-se a tricotomia (retirada de pelos) da região dorsal de cada animal (Figura 1-A). Após a tricotomia, cada rato foi pesado e recebeu três cortes padronizados no dorso com 0,5 cm de diâmetro cada (Figura 1B e 1C), feitos com auxílio do *punch* (Figura 1B1). Com tesoura de íris reta de 11 cm e pinça de Adson, retirou-se os fragmentos, expondo até a fáscia dorsal muscular. A hemostasia foi realizada, quando necessária, através de tamponamento compressivo com gaze por dois minutos. Em seguida, iniciou-se os tratamentos (Figura 1D).

Durante 14 dias os tratamentos foram aplicados diariamente. O peso dos animais

também foi avaliado diariamente do início ao final dos tratamentos. Durante todo o período em que os animais estiveram em experimentação, foram mantidos nas mesmas condições: em gaiolas de polipropileno individuais forradas com serragem e identificadas com etiquetas, com suprimento de água *ad libitum*, ração balanceada e luz em regime de 12h/12h. O procedimento operatório e o tratamento pós-operatório transcorreram sem complicações. Todos os animais recuperaram-se bem da anestesia, demonstrando bom estado geral, atividades física e comportamental normais para a espécie.

Coletou-se fragmentos das feridas nos 4º, 7º e 14º dias de experimentação. A ferida da qual era coletada a amostra era suturada logo em seguida (Figura 1E). No quarto dia de tratamento coletou-se fragmentos com borda e centro da ferida da lesão mais próxima à cabeça, lesão nº 1, de todos os animais dos 4 grupos. No sétimo dia de tratamento coletou-se fragmentos com borda e centro da ferida da lesão nº 2 de todos os animais dos 4 grupos. E ao final do experimento, no décimo quarto dia de tratamento, coletou-se fragmentos com borda e centro da ferida da lesão mais próxima à cauda, lesão nº 3, de todos os animais dos 4 grupos. No décimo quarto dia, também, sacrificaram-se todos os animais com doce excessiva do barbitúrico tiopental sódico, aplicado via injeção intramuscular na região da coxa, método simples, rápido e relativamente indolor ao animal. O descarte dos ratos sacrificados ficou sob responsabilidade do Biotério.

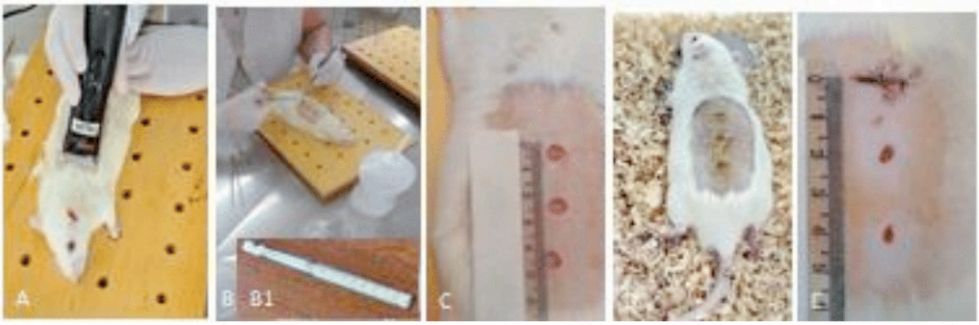


Figura 1. Procedimentos Metodológicos: A - tricotomia; B - lesão padronizada, em B1: punch; C - lesões; D - aplicação da pomada e E - retirada da primeira lesão.

Fonte : os autores

Para análise histopatológica, as amostras de pele dos animais seguiram para os procedimentos histotécnicos de rotina, os tecidos foram corados com hematoxilina e eosina. A avaliação do processo de redução das áreas das lesões, a análise macroscópica, foi feita através de medição com régua e imagens realizadas com câmera de smartphone acoplado em haste fixa de metal, nos 1º, 4º, 7º e 14º dias de experimento, nos demais dias apenas realizou-se aplicação dos tratamentos (Figura 2). Aspectos externos da ferida também foram analisados.

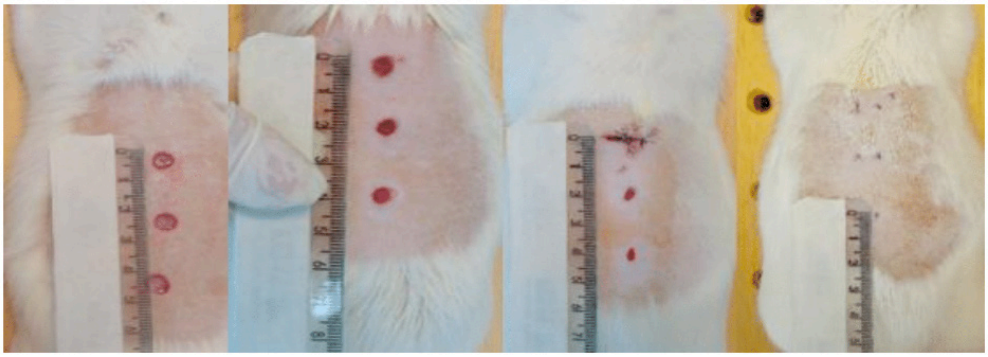


Figura 2. Evolução da cicatrização de feridas de um rato tratado com pomada com princípios ativos, da esquerda para a direita: 1º dia (abertura da ferida e início do tratamento), 4º dia, 7º dia e 14º dia.

Fonte : os autores

A análise microscópica foi feita pelo levantamento dos tipos de tecidos e células de cicatrização formados, analisados por meio das lâminas feitas com as amostras extraídas das feridas. Destacou-se três elementos do processo cicatricial para a avaliação comparada da eficácia dos tratamentos: crosta, tecido de granulação e regeneração epitelial (tecido epitelial).

2.2 Análise de dados

A área de cada ferida foi analisada por meio das fotografias com o auxílio do software "FIJI – Image J for Windows®" e os dados obtidos organizados numa planilha do software Microsoft Office Excel 2010®.

A cada elemento cicatricial analisado, de cada ferida, em cada dia, foi atribuído um escore de 0 a +4, de acordo com os tipos e quantidades de tecido e células observados na análise microscópica. Os dados foram compilados numa planilha do software Microsoft Office Excel 2010®.

3 I RESULTADOS

3.1 Análise macroscópica

As áreas das feridas 01, 02 e 03 foram analisadas estatisticamente, por grupo, a um nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$). Após os cálculos preliminares (média aritmética simples, desvio-padrão, E.P.M.), realizou-se o Teste de Homogeneidade de Variâncias de Levene, como pré-requisito para o teste de ANOVA; seguido do Teste de ANOVA, para comparação das médias e do Teste de Tukey para comparações múltiplas entre os tratamentos, quando necessário (se o Teste de ANOVA indicasse variância significativa).

Os resultados dos testes mostraram que apenas as áreas das feridas 01 tratadas

com soro fisiológico a 0,9% e com Dersani® apresentaram diferença significativa entre si (Dersani® com área significativamente menor, p-Valor = 0,0031), devido à grande diferença entre alguns valores pequenos obtidos para o primeiro tratamento e alguns valores grandes obtidos para o segundo. As áreas das feridas 02 e 03, nos diferentes tratamentos, não apresentaram diferenças significativas. A ferida 01 refere-se àquela que foi acompanhada apenas até o 4º dia de experimento, sendo sutura nesse dia, por isso a diferença significativa apenas neste momento não é muito representativa, uma vez que a mesma diferença não foi observada nas feridas relativas aos outros dois dias (7º e 14º).

Aos 4 dias (Figura 3), no grupo tratado com soro (S4), observou-se ferida com uma discreta área hiperêmica com crosta fina e clara, não se observou sangramento, edema ou secreção; nos animais do grupo tratado com o veículo (V4) verificou-se uma área hiperêmica maior, com crosta fina e clara; no grupo tratado com a pomada de ora-pro-nóbis (OP 4) observou-se área hiperêmica com crosta fina e clara, sem sangramento, edema ou secreção, e no grupo tratado com o Dersani® (D4) observou-se uma área hiperêmica menor, com pequena crosta seca e escura (seta pontilhada).

Aos 7 dias (Figura 3), no grupo tratado com soro (S7) observou-se uma discreta área hiperêmica, porém, sem crosta e não se observou sangramento, edema ou secreção; entretanto nos animais do grupo tratado com o veículo (V7) verificou-se uma área hiperêmica maior (seta curta) com odor e presença de crosta fina (Figura - seta pontilhada); no grupo tratado com a pomada (OP 7) a área hiperêmica apresentou-se sem crosta, sangramento, edema ou secreção e no grupo tratado com o Dersani® (D7) observou-se uma área hiperêmica menor e com pequena crosta seca (seta pontilhada).

Aos 14 dias (Figura 3), observou-se a área da lesão fechada no grupo tratado com soro (S14); no grupo tratado com o veículo (V14) a lesão superficialmente reparada; no grupo tratado com a pomada (OP 14) a lesão finamente fechada e no grupo tratado com Dersani® (D14), a lesão também finamente fechada.

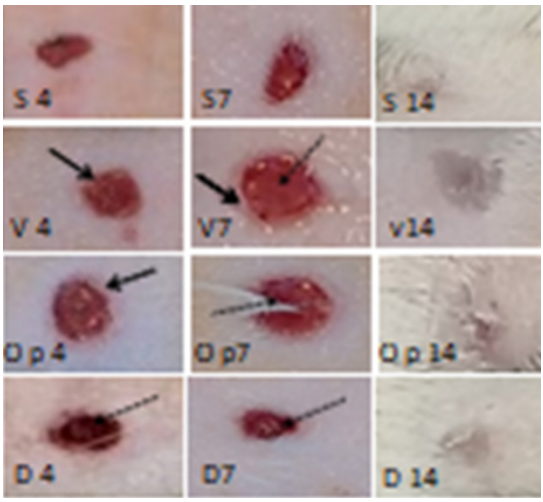


Figura 3. Evolução macroscópica da área total da lesão acompanhada por fotografias das áreas no 4º, 7º e 14º dias: S - grupo tratado com soro fisiológico; V - grupo tratado com o veículo; Op - grupo tratado com pomada de ora-pro-nóbis e D - grupo tratado com Dersani®.

Fonte : os autores

3.2 Análise microscópica

A análise das lâminas preparadas com amostras de tecido das feridas permitiu a atribuição de escores a cada elemento do processo cicatricial de cada ferida (crosta, tecido de granulação e regeneração epitelial), para cada dia. Os escores relativos a cada elemento do processo cicatricial foram calculados e analisados estatisticamente, comparando-se os grupos por dia (4, 7 e 14 dias após a incisão das feridas), a um nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$). Após os cálculos preliminares (média aritmética simples, desvio-padrão, E.P.M.), realizou-se o Teste de Homogeneidade de Variâncias de Levene como pré-requisito para o Teste de ANOVA; seguido do Teste de ANOVA para comparação das médias e do Teste de Tukey para comparações múltiplas entre os tratamentos, quando necessário (se o Teste de ANOVA indicasse variância significativa).

4º Dia de experimento: com relação à formação de crosta, observou-se que o escore médio do grupo tratado com a pomada 2 foi significativamente menor que aqueles dos outros grupos comparados (p-Valor = 0,0021 para o soro, p-Valor = 0,0021 para a pomada 1 e p-Valor = 0,0471 para o Dersani®), e, com relação à formação de tecido de granulação, significativamente maior que aquele do grupo tratado com soro fisiológico (p-Valor = 0,0233). Entretanto, não apresentou diferença significativa em outras comparações. Isso indica que, em 4 dias, o grupo tratado com a pomada 2 apresentou melhora significativa no processo cicatricial em relação aos demais grupos, pelo menos no que diz respeito a formação de crosta.

7º Dia de experimento: com relação à formação de crosta, observou-se que o escore

médio do grupo tratado com a pomada 2 foi significativamente menor que os dos grupos tratados com soro (p-Valor = 0,0167) e Dersani® (p-Valor = 0,0011), e, com relação à formação de tecido de granulação, significativamente maior que aquele do grupo tratado com a pomada 1 (p-Valor = 0,0301). Entretanto, não apresentou diferença significativa em outras comparações. Isso indica que, em 7 dias, o grupo tratado com a pomada 2 ainda apresentava melhora significativamente maior do que os grupos tratados com soro e Dersani® e maior quantidade de tecido de granulação do que o grupo tratado com a pomada 1.

14º Dia de experimento: com relação à formação de tecido de granulação, observou-se que o escore médio do grupo tratado com a pomada 2 foi significativamente maior que aquele do grupo tratado com soro (p-Valor = 0,0106) e, com relação à regeneração epitelial, significativamente menor que aquele do grupo tratado com Dersani® (p-Valor = 0,0057). Entretanto, não apresentou diferença significativa em outras comparações.

Constatou-se, portanto, que a pomada de ora-pro-nóbis na concentração de 10% apresentou um desempenho positivo em relação aos demais grupos quanto à diminuição da formação de crosta nas feridas nas etapas inicias (primeiros 7 dias) do processo cicatricial e em relação ao soro fisiológico quanto à promoção da formação de tecido de granulação, ao passo que não mostrou destaque na promoção da formação de tecido epitelial em relação aos demais grupos analisados, inclusive sendo menos efetiva que o Dersani® nesse quesito. A falta de uniformidade e de diferença significativa em relação às demais comparações dos três dias não permite inferir mais do que o exposto.

Aos 4 dias de tratamento (Figura 4) com a pomada de ora-por-nóbis (OP4) não observou-se a presença de crosta fibrinoleucocitária, o mesmo não aconteceu com os outros tratamentos: (S4), tratado com soro fisiológico, o grupo (V4), tratado somente com o veículo e o grupo (D4), tratado com o Dersani®, os quais apresentaram crosta fibrinoleucocitária (asterisco). Observou-se a presença de células de defesa (seta pontilhada), o que caracteriza essa fase inflamatória. Aos 7 dias (Figura 4) pôde-se observar o uma evidente neovascularização nos grupos tratados com a pomada (OP7) e com o Dersani® (D7), esse aumento do suprimento sanguíneo e sua vasodilatação facilitam a migração de células inflamatórias como neutrófilos, macrófagos e linfócitos, elementos que fazem parte da fase inflamatória, enquanto que nos outros dois grupos (S7) e (V7) tratados com soro e veículo, respectivamente, ainda se observava presença de crosta fibrinoleucocitária. Aos 14 dias (Figura 4), pôde-se observar uma reepitelização total nas áreas das feridas em todos os tratamentos, diferindo apenas em espessura, inclusive com a formação da camada córnea (seta curta), de papilas dérmicas e ainda grande vascularização (seta longa).

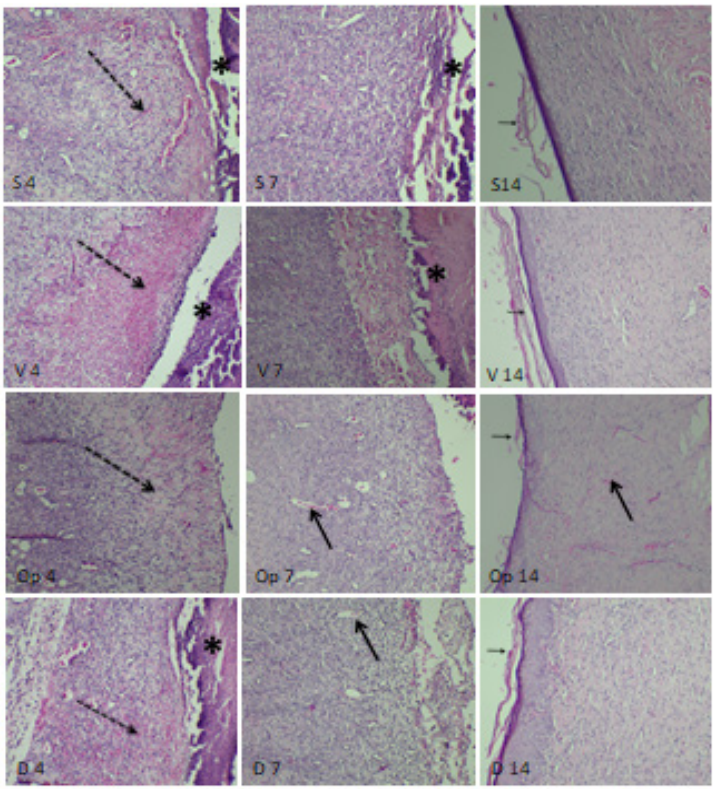


Figura 4. Fotomicrografias dos aspectos histopatológicos das feridas com 4, 7, 14 dias de tratamento (H.E.) 10X: S - grupo tratado com soro fisiologico; V - grupo tratado com o veículo; Op - grupo tratado com pomada de ora-pro-nóbis e D - grupo tratado com Dersani®.

4 I DISCUSSÃO

O extrato etanólico das folhas da planta e as pomadas (pomada 1 – somente veículo - e pomada 2 - veículo + extrato etanólico) foram confeccionados e armazenados conforme orientações dadas. O procedimento operatório e o tratamento pós-operatório dos ratos transcorreram sem complicações. Todos os animais recuperaram-se bem da anestesia, demonstrando bom estado geral, atividades física e comportamental normais para a espécie.

Os dados obtidos a partir da análise macroscópica mostraram que não houveram diferenças significativas na velocidade de fechamento das feridas entre os tratamentos aplicados. Pela análise microscópica e atribuição dos escores observou-se que a tendência na evolução de todas as feridas foi a diminuição da quantidade de crosta e aumento da de tecidos de granulação e epitelial. Isso é o que se espera que aconteça ao longo do processo cicatricial normal, sem infecções, novas lesões ou outras complicações (MANDELBAUM *et al.*, 2003; DOMINGUES).

Os resultados das análises histopatológica e estatística mostraram que a pomada de extrato etanólico de ora-pro-nóbis na concentração de 10% foi mais eficaz nos primeiros estágios do processo cicatricial (i.e., nos primeiros 7 dias de tratamento), em comparação aos demais tratamentos, uma vez que diminuiu a quantidade de crosta nas feridas. No geral, os resultados microscópicos mostraram grandes diferenças entre a pomada de ora-pro-nóbis e os outros tratamentos quanto a formação de crosta e a maior eficiência da pomada de ora-pro-nóbis na promoção de tecido de granulação em relação ao soro fisiológico a 0,9%. Para regeneração epitelial, o tratamento com Dersani® foi significativamente mais eficiente que as duas pomadas (com e sem princípio ativo). A diminuição da crosta durante o processo cicatricial é um evento importante, uma vez que feridas abertas com crostas cicatrizam mais lentamente (MANDELBAUM et al., 2003), indicando a efetividade da pomada 2.

Sabe-se que compostos fenólicos e terpenoides possuem ação antioxidante e que tal atividade ajuda a evitar o estresse oxidativo no processo inflamatório, ajudando a acelerar o processo de cicatrização e evitar os sinais flogísticos (CARVALHO et al., 2014; PINTO et al., 2015). Tais substâncias, além de outras (alcaloides, flavonoides e fitoesteróis) tem sido encontradas em análises fitoquímicas das folhas de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) e relatadas na literatura (Pinto et. al, 2012; Pinto et al., 2015; Souza et al., 2016), entretanto a impossibilidade de fazer uma análise química do extrato obtido (isolamento de constituintes) e verificar a ação isolada e em conjunto de cada um dos seus componentes fitoquímicos no processo cicatricial impedem qualquer afirmação conclusiva sobre os princípios ativos e suas atividades farmacológicas, neste presente trabalho.

A significativa ação da pomada do extrato etanólico a 10% na prevenção da formação de crostas nas feridas nos primeiros estágios, onde predomina-se o processo inflamatório e de regeneração, parece indicar a ação positiva do extrato etanólico no processo cicatricial, uma vez que os ratos tratados apenas com a pomada 1 não demonstraram melhora significativa para nenhum elemento cicatricial em relação aos outros tratamentos, nem mesmo em relação ao soro fisiológico a 0,9% (o tratamento mais simples dentre quatro aplicados), o que parece indicar que algum(s) componente(s) do extrato atuou(aram) durante o processo, de forma que a pomada 2 tenha proporcionado uma melhora significativa para os ratos do grupo 3, pelo menos nos 7 primeiros dias, em relação aos outros grupos, de forma semelhante como é relatado na literatura por Carvalho et al. (2014) (relataram melhora significativa na morfologia de fibroblastos L929 de camundongos Swiss tratados com extrato hidrometanólico das folhas de *Pereskia aculeata* Miller, fibroblastos são elementos importantes na fase de regeneração do processo cicatricial) e Pinto et al. (2015) (relataram atividade anti-inflamatória da fração hexanóica do extrato metanólico das folhas da planta em ratos Wistar e camundongos Swiss).

Aos 4 dias de tratamento, não se observou formação de crosta apenas nas feridas dos ratos tratados com a pomada 2 (Figura 4). Aos 7 dias pôde-se observar o uma evidente

neovascularização nos grupos tratados com a pomada 2 (OP7) e com o Dersani® (D7) (Figura 4), enquanto que nos outros dois grupos não se observou o mesmo. Esse aumento do suprimento sanguíneo e sua vasodilatação facilitam a migração de células inflamatórias como neutrófilos, macrófagos e linfócitos, bem como o transporte de nutrientes e moléculas informacionais (DOMINGUES).

Mais testes, com outros procedimentos (concentrações de princípio ativo, formas farmacêuticas, processos de extração, líquidos extratores e testes experimentais) são necessários para que se possa retificar ou ratificar os resultados obtidos neste presente trabalho. A preparação de pomada de extrato de ora-pro-nóbis por meio da maceração das folhas em álcool etílico absoluto por 24 horas pode não ter sido a melhor forma de manter os componentes fitoquímicos já identificados na planta e já relatados como tendo atividade anti-inflamatória e positiva no processo cicatricial, ou a concentração foi insuficiente para promover a regeneração epitelial e a formação de tecido de granulação de forma uniforme, daí os resultados pouco elucidativos depois do 7º dia de tratamento.

5 I CONCLUSÃO

A presente pesquisa demonstrou que a pomada a 10% feita a partir do extrato etanólico (macerado) das folhas frescas de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) aplicada nas feridas dorsais cutâneas de ratos (*Rattus norvegicus*) machos adultos da linhagem Wistar teve ação na prevenção da formação de crostas nas feridas nos primeiros estágios do processo cicatricial (i.e, primeiros 7 dias), o que indica que algum(uns) componente(s) fitoquímico(s) pode(m) ter atuado, entretanto novos testes devem ser realizados a fim de retificar ou ratificar os resultado aqui obtidos. A pomada da planta causou significativa melhora nas feridas com relação à formação de crosta, com relação aos demais grupos, e também quanto à formação de crosta e tecido de granulação se comparada ao soro fisiológico a 0,9%. Entretanto, não apresentou resultados uniformes para os outros elementos cicatriciais em outros dias, o que não permite inferir mais do que o mencionado acima.

Análises fitoquímicas de precisão e mais testes precisam ser feitos no sentido de identificar, isolar e avaliar o(s) princípio(s) ativo(s) presentes nos extratos de vários tipos da planta, alguns princípios ativos talvez com atividade terapêutica para alguma doença ou injúria para o qual podem ainda não ter sido testados, o que poderia proporcionar um avanço para a indústria farmacêutica, no sentido de fornecer matérias-primas e bases para a química sintética elaborar novos medicamentos.

REFERÊNCIAS

CARVALHO, E. G; SOARES, C.; BLAU, L. et al. Wound healing properties and mucilage content of *Pereskia* aculeata from different substrates. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. p. 678–681, 2014.

DEWICK, P.M. **Medicinal natural products:** a biosynthetic approach. 3 ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2009, 550p.

DOMINGUES, R.J.S. *et al*. CICATRIZAÇÃO DE FERIMENTOS INCISIONAIS EM RATOS SUBMETIDOS A ALIMENTAÇÃO COM CARNE SUÍNA. **Revista Paraense de Medicina** - V.28 (3) julho-setembro 2014

EVANS W. C. **'Trease and Evans' pharmacognosy**. 16. ed. London: WB Saunders Company, 2009.

MANDELBAUM, S. H.; SANTIS, E. P. DI.; MANDELBAUM, M. H. S. **Cicatrização: Conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I.** Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 78, n. 5, p. 525–542, 2003.

MENEZES, R. F. D. E. **Da história da farmácia e dos medicamentos**, p. 46, 2005.

NOGUEIRA, P. C. et al. **Incidência de úlcera por pressão na Unidade Intensiva de Neurocirurgia do HCFMRP-USP**. Revista Qualidade HC – USP. Ribeirão Preto, p. 76-82, dez. 2012.

PINTO, N. C. C. Cytotoxic and antioxidant activity of *Pereskia aculeata* Miller. **Pharmacology online**, Paestum, dez 2012, v. 3. p. 63-69.

PINTO, N. C. C. et al. **Atividade antinociceptiva da partição hidrometanólica do extrato bruto das folhas de *Pereskia aculeata* Miller**. Dissertação (mestrado em Ciências Famacêuticas). Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora. 2010.

PINTO, N. C. C. *Pereskia aculeata* Miller leaves present in vivo topical anti-inflammatory activity in models of acute and chronic dermatitis. **Journal of Ethnopharmacology**, Ireland, jul. 2015. p. 331-336.

SANTOS, J. B.; PORTO, S. G.; SUZUKI, L, M. et al. Avaliação e tratamento de feridas. Porto Alegre, Hospital das Clínicas. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/34755/000790228.pdf>. Acesso em 6 de outubro de 2019.

SOUZA, L.F.; CAPUTO, L.; BARROS, I. B. I. et al. *Pereskia aculeata* Miller (Cactaceae) leaves: chemical composition and biological activities. **International Journal of Molecular Science**, New York, 2016.

TELLES, C. C.; MADEIRA, N. R.; GONÇALVES, N. B. et al. *Pereskia aculeata* (ora-pro-nóbis). **EMBRAPA hortaliças**, dez 2017. p.280-289.

CAPÍTULO 5

ASPECTOS BIOLÓGICOS DA VIOLÊNCIA OBSTÉTRICA

Data de aceite: 26/05/2021

Monique Rafaela de Oliveira Silva Lopes
Universidade do Vale do Paraíba
Faculdade de Educação e Artes
http://lattes.cnpq.br/6534428286872489

Kátia Zeny Assumpção Pedroso
http://lattes.cnpq.br/0264865134705957

Relatório Final apresentado como parte das exigências da disciplina Trabalho de Graduação à Banca Avaliadora do Curso de Ciências Biológicas da Faculdade de Educação e Artes da Universidade do Vale do Paraíba.

RESUMO: A gestação é um período de transformações intensas de âmbito biológico e psicológico que culminarão no aumento das necessidades nutricionais, alterações no metabolismo, no sistema endócrino, sistema imunológico, alterações biofísicas, nos fatores bioquímicos, entre outras mudanças que são necessárias para manutenção da gravidez. Embora a gravidez e o nascimento possam ocorrer sem nenhuma intercorrência, na maioria dos casos, o modelo obstétrico no Brasil expõe as mulheres a altas taxas de intervenções com grande potencial de provocar danos. Essas intervenções e condutas desnecessárias são conhecidas como violência obstétrica e podem potencializar os riscos a mãe e ao bebê, além de causar lesões e danos permanentes aos envolvidos. O objetivo desse trabalho foi identificar nos relatos de experiência de mulheres, aspectos biológicos relacionados a violência obstétrica durante o parto. Para isso, inicialmente foi realizada uma pesquisa aprofundada sobre o tema violência obstétrica, em seguida recebeu-se os relatos de experiência, e através das intervenções identificadas neles, buscou-se relacionar a violência obstétrica com os aspectos biológicos advindos dela. Com isso, pode-se observar que a violência obstétrica gera diversos danos de natureza biológica ao binômio mãe e recém-nascido, gerando consequências sérias como: injúria tecidual, hemorragia, lacerações, dor, edema, processos dolorosos e demorado de cicatrização e alterações hormonais, todos em decorrência de procedimentos inadequados na rotina médico/hospitalar.

PALAVRAS-CHAVE: Parto, gestação, violência contra a mulher, humanização.

ABSTRACT: Pregnancy is a period of intense biological and psychological transformations that will culminate in increased nutritional needs, changes in metabolism, in the endocrine system, immune system, biophysical changes, in biochemical factors, among other changes that are necessary to maintain pregnancy. Although pregnancy and birth can occur without any complications, in most cases, the obstetric model in Brazil exposes women to high rates of interventions with great potential to cause harm. These unnecessary interventions and behaviors are known as obstetric violence and can increase the risks to the mother and baby, in addition to causing permanent injuries and damages to those involved. The objective of this work was to identify, in the experience reports of women,

biological aspects related to obstetric violence during childbirth. For this, an in-depth research was carried out on the topic of obstetric violence, then the reports of experience were received, and through the interventions identified in them, we sought to relate obstetric violence with the biological aspects arising from it. Thus, it can be observed that obstetric violence generates several biological damages to the binomial mother and newborn, generating serious consequences such as: tissue injury, hemorrhage, lacerations, pain, edema, painful and delayed healing processes and hormonal changes , all due to inadequate procedures in the medical / hospital routine.
KEYWORDS: Childbirth, pregnancy, violence against women, humanization.

1 I INTRODUÇÃO

A gravidez surge como um momento excepcional, uma experiência única e intensa, para a reformulação de todos os valores vitais da mulher, em que os pensamentos desta, já se embalam na perspectiva de uma grande alteração de vida, e esse sentimento aumenta exponencialmente ao se fazer o primeiro ultrassom, e ter a certeza de que um novo ser se forma em seu ventre. Nesse período as mudanças vão muito além das fisiológicas, ocorrendo diversas modificações nas esferas biológicas, somáticas e psicológicas, que refletem tanto na dinâmica individual da mulher, como nas relações que ela exerce com a sociedade. A própria identidade da mulher passa por transformações importantes (MALDONADO, 1976; PICCININI *et al.*, 2008).

Ainda que se obtenha um pré-natal adequado, para muitas mulheres, quando é chegado o momento do parto, não é permitido que sejam protagonistas nessa atividade, estima-se que ¼ delas sofrem maus tratos e intervenções desnecessárias por parte da equipe médico hospitalar (TESSER *et al.*, 2015).

Esses maus tratos vão desde insultos ou ofensas a parturiente, até uso desnecessário de medicamentos e procedimentos, privação de alimentação, cesárias eletivas, e muitas outras más condutas, que podem ocorrer ao longo da gestação, no pré- parto, parto ou pós-parto, bem como no abortamento, e são chamadas de violência obstétrica, embora no Brasil, ainda não se obteve um consenso em relação a esse conceito (DINIZ *et al.*, 2015; ZANARDO *et al.*, 2017).

O conhecimento de histórias verídicas sobre a violência obstétrica, quando em campo de estágio, em uma conversa com colega, motivou o interesse no estudo do tema, bem como em compreender quais os aspectos biológicos resultam dessa prática nas mulheres envolvidas. Ou seja, o estudo visa mostrar como procedimentos físicos, realizados de maneira errônea no momento do parto podem culminar em danos biológicos para as mulheres envolvidas.

2 I OBJETIVOS

Identificar os aspectos biológicos relacionados à violência obstétrica durante o parto, através do relato de experiência de mulheres.

3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Violência Obstétrica

O modelo obstétrico predominante no Brasil, expõe as mulheres e recém-nascidos a altas taxas de intervenções com grande potencial de provocar danos. Tais intervenções, como a episiotomia, o uso de ocitocina, e a cesariana, além de outras, que deveriam ser utilizadas de forma criteriosa, apenas em situações de necessidade, atualmente são rotineiras e atingem quase a totalidade das mulheres que dão à luz em hospitais no país. Uma assistência inadequada pode adicionar ou potencializar os riscos, aumentando as mortes evitáveis de mulheres e bebês, bem como lesões e sequelas permanentes (ZANARDO *et al.*, 2017).

Ao longo da história as mulheres são conhecidas como as mais prováveis vítimas da violência (WOLFF; WALDOW, 2008). E por definição, a violência contra a mulher refere-se a toda e qualquer ação que fere sua dignidade e sua integridade física e/ou psicológica, ou ainda, qualquer ação ou omissão baseada no gênero que lhe cause morte, lesão, sofrimento físico, sexual ou psicológico e dano moral ou patrimonial.

Esse tipo de violência, é uma questão de violação dos direitos humanos, e é amplamente conhecida como problema de saúde pública, ocasionando as envolvidas severas sequelas orgânicas e emocionais (MARCACINE *et al.*, 2018; FONSECA; RIBEIRO; LEAL, 2012).

Dentre as formas de violência de gênero anteriormente citadas, está a violência obstétrica, tipo de violência também institucional, atrelada a relações de poder, em que os profissionais de saúde se apropriam dos corpos e dos processos reprodutivos das parturientes (SERRA, 2018).

Ela também pode ser caracterizada como imposição de um grau significativo de dor e sofrimento evitáveis, que vão desde agressões físicas, psicológicas, verbais, simbólicas, sexuais até negligências nas assistências, bem como medicalização excessiva e inapropriada, discriminação, cesáreas eletivas e sem real necessidade, intervenções no parto e a realização de práticas desagradáveis e dolorosas, não baseadas em evidências científicas (FERREIRA, 2019; ZANARDO *et al.,* 2017).

Nas instituições de saúde tem-se uma violência consentida por mulheres em trabalho de parto e parto, por parte dos profissionais de saúde que consideram essas atitudes desrespeitosas como normal e parte da rotina. As parturientes acabam se omitindo por medo, por opressão, ou por estarem vivenciando um momento muito especial nas suas vidas: o nascimento de um bebê (WOLFF; WALDOW, 2008).

Porém, nesse momento marcante na vida de uma mulher, ela deveria ser protagonista da sua própria história, podendo escolher qual a melhor forma de dar à luz, e com direito a uma assistência à saúde adequada, com o apoio de profissionais de saúde capacitados, que acima de tudo estejam comprometidos com a fisiologia do nascimento e respeitem a

gestação, o parto e a amamentação como processos sociais e fisiológicos (REDE PARTO DO PRINCÍPIO, 2012).

3.2 Violência obstétrica no parto e sua relação com a biologia

O parto e o nascimento eram considerados como um momento fisiológico e feminino, vivenciado nas casas de famílias com o auxílio de parteiras, porém, a partir de meados do século XX, houve uma crescente hospitalização e mercantilização dessa prática, acentuada pelos avanços tecnológicos em medicina, que vão desde novas tecnologias de reprodução assistida ao ultrassom obstétrico, e neste modelo tecnocrático, a mulher deixa de ser protagonista, tornando-se o médico condutor do processo (NUCCI; NAKANO; TEIXEIRA, 2018; ZANARDO *et al.*, 2017).

A partir dessa alteração na forma de nascer, o trabalho de parto passou a necessitar do ambiente hospitalar para acontecer, com as devidas tecnologias para possíveis intervenções, pois o trabalho de parto e parto se tornaram eventos de risco para a mãe e seu bebê, e o ambiente hospitalar é o mais propício para que a mulher sofra intervenções de forma indiscriminada (PEREIRA *et al.*, 2019).

Embora o cuidado obstétrico apropriado, realizado com o uso adequado da tecnologia possa reduzir uma parcela importante das complicações, que podem ocorrer ao longo do trabalho de parto e parto, o seu uso inadequado ou realização de intervenções desnecessárias podem trazer prejuízos para a mãe e o bebê (LEAL *et al.*, 2014). Sendo assim necessário se respeitar a fisiologia natural do evento.

A dor representa uma importante função biológica tanto para organismo, alertando para algum distúrbio, quanto para o parto, indicando seu início. Ela ocorre pelos estímulos transmitidos pelas estruturas pélvicas tanto de origem visceral quanto somáticas, contração uterina atrelada a dilatação do colo do útero, distensão das fibras uterinas e do canal de parto, bem como pressão na uretra, bexiga, estruturas pélvicas e raízes do plexo lombo-sacro, sendo assim uma das precursoras da progressão fisiológica do trabalho de parto (BARBIERI *et al.*, 2013; ALMEIDA *et al.*, 2008).

Todo esse evento culmina num grande estresse fisiológico, mecanismo biológico de defesa, que gera uma resposta adaptativa neuroendócrina, ou seja, influenciado pelo aumento na secreção de adrenalina, ativa imediatamente o sistema nervoso simpático, em seguida ativa hipotálamo-hipófise-adrenal, gerando aumento nos níveis plasmáticos dos hormônios corticotrofinas, hormônio adrenocorticotrófico e do cortisol (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Esses hormônios precisam estar em equilíbrio, a fim de atuarem de forma plena para o sucesso do trabalho de parto. Se a gestante fica exposta ao medo e tensão durante o trabalho de parto, a dor do parto é potencializada pois enrijece a musculatura e dificulta a dilatação do colo, por exemplo. De acordo com Almeida *et al.* (2008) a hipóxia da musculatura uterina, bem como o estiramento da cérvice uterina, vagina e períneo durante

o período expulsivo do trabalho de parto, o estresse (níveis aumentados de glicocorticóides e catecolaminas) e o limiar baixo de tolerância à dor (baixos níveis de endorfina, fadiga e doença), são outros fatores causadores ou potencializadores desta dor.

Outro hormônio fundamental no processo do parto é a ocitocina, produzida pelo hipotálamo e armazenada na hipófise posterior, é responsável pelo estímulo das contrações uterinas, e também atua na amamentação pois está associada ao processo de ejeção do leite, possuindo assim, atuação central no trabalho de parto (NUCCI; NAKANO; TEIXEIRA, 2018).

Seu efeito de contração uterina foi descrito em 1906, e a substância sintetizada em laboratório em 1953, sendo a partir daí utilizada para induzir/acelerar nascimentos e se tornando peça importante para o protagonismo médico e crescimento da hospitalização dos partos, associada a outras intervenções como episiotomia, posição litotômica e Manobra de Kristeller (RUSSO; NUCCI, 2020).

A episiotomia (Figura 1) é um procedimento introduzido na obstetrícia sob a alegação de que traria benefícios a parturiente e seu bebê, e consiste numa incisão cirúrgica na região do períneo, com o objetivo de aumentar a abertura vaginal. Essa prática pode ocasionar na mulher projeção da parede frontal do reto na parede posterior vaginal, o que também pode ocorrer com a bexiga, além de causar aumento no sangramento, aumento na possibilidade de infecções, no desconforto, no tempo de recuperação após o parto, problemas sexuais e incontinência urinária. Tornou-se um procedimento rotineiro, embora não haja evidências científicas sobre sua efetividade, sendo assim existe a intenção de torná-la um evento restrito e não rotineiro, levando-se em consideração a individualidade de cada caso para utilizá-la ou não (FRIGO *et al.*, 2014; SALGE *et al.*, 2012; BALAREZ; BRANCO, 2018).

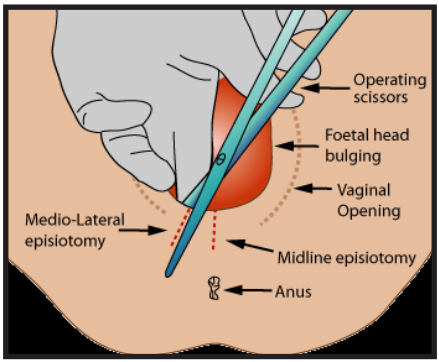


Figura 1 - Representação do procedimento para a episiotomia.

Fonte: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/34/Medio-lateral-episiotomy.gif

A posição litotômica, foi introduzida no trabalho de parto para conforto do médico e sua equipe, desrespeitando o mecanismo fisiológico do parto, dificultando a movimentação

da mulher, aumentando seu cansaço, a duração do período expulsivo e as intervenções obstétricas; em contrapartida, as diversas posições verticais existentes colaboram para redução do período expulsivo, redução das taxas de partos assistidos e de episiotomias (CRIZÓSTOMO; NERY; LUZ, 2007; NILSEN; SABATINO; LOPES, 2011; MAZZALI; GONÇALVES, 2008).

A manobra de Kristeller (Figura 2) é uma prática que o no segundo período do parto, e consiste numa pressão aplicada no fundo uterino (parte superior do útero), com o intuito de diminuir o trabalho de parto. Porém não se tem nem um consenso de como o procedimento deve ser realizado, uma vez que alguns médicos o fazem com as mãos, outros com os braços, ou até com o cotovelo, o que não permite avaliar a intensidade da pressão exercida, assim como não se tem evidências do seu benefício. A prática pode ocasionar um aumento no risco de morbidade materna e fetal, lacerações perineais severas, aumento nas taxas de episiotomia, lesão no esfíncter anal, além de fraturas e danos cerebrais ao recém-nascido (CARVALHO, 2014; CONITEC, 2016; LIMA; LOPES, 2019).

Figura 2 - Representação da Manobra de Kristeller.

Fonte: Autora.

Em relação ao parto, o processo de intervenções rotineiras e desnecessárias gera uma reação em cadeia de eventos, em que uma acaba levando a outra, alterando o curso fisiológico do parto e aumentando os riscos (SCHNECK; RIESCO, 2006).

4 I METODOLOGIA

Trata-se de um estudo descritivo, com abordagem qualitativa, cujos dados foram gerados da seguinte forma: durante a prática em estágio na Secretaria de Urbanismo e Sustentabilidade da prefeitura de São José dos Campos surgiu uma conversa com uma colega de turma sobre o tema Violência Obstétrica (VO). Essa colega demonstrou interesse me informou que conhecia mulheres de seu contato próximo, que passaram por situações relacionadas à VO. Pediu então, que tais mulheres enviassem mensagens para a autora

descrevendo sua experiência no parto.

Dessa forma, via WhatsApp, sem contato prévio, ou roteiro, sem qualquer sugestão ou interferência da autora, foram encaminhadas mensagens por áudio de quatro mulheres, relatando o que vivenciaram em seus partos, relacionados à VO. Os áudios foram transcritos e selecionaram-se trechos exatamente conforme descritos nas mensagens, que evidenciavam a violência experienciada (Quadro 1). O interesse em estudar o tema violência obstétrica trouxe o desafio de buscar entender sua relação com a prática de estudo em biologia.

O relato de cada mulher foi identificado com letra seguida de número, da seguinte forma: R1, R2, R3 e R4. Optou-se pela apresentação em quadro, demonstrando o relato do trecho selecionado, o aspecto de violência obstétrica identificado e a relação com a biologia.

Buscou-se apresentar diferentes tipos de VO descritos, evitando assim repetições das mesmas situações, manteve-se a ocorrência de tipos diferentes de VO no relato de uma mesma mulher.

5 I RESULTADOS

Através da análise dos relatos encaminhados, e da revisão de literatura sobre o tema, foi possível estabelecer uma conexão entre as práticas da violência obstétrica e suas consequências biológicas para as mulheres envolvidas, descritas no Quadro 1.

Relato	Prática de violência obstétrica	Aspecto biológico relacionado
R1 *- **"...fizeram um corte** a mais do que o famoso pick e puxaram minha filha!"*	Episiotomia	Injúria tecidual produzida cirurgicamente entre a mucosa do canal vaginal e períneo.
R2 *- "E deparei com aquela cena de terror, o avental da médica estava todo ensanguentado**, o chão parecia que tinha chovido sangue, uma cena muito feia"***	Sangramento excessivo durante o parto	Hemorragia durante o parto relacionada as intervenções.
R2 *- "...precisei de uns 70 pontos. **Pois havia uma laceração da vagina ao ânus**. Deram anestesia. Fui pro quarto... Mas **as dores eram terríveis,** tive que fazer compressa com gelo no local dos pontos por dias, **porque o lugar inchou muito."***	Laceração e sutura extensa Dor intensa Edema	Injúria tecidual no períneo no parto relacionada à manobra de empurrar o útero para o bebê nascer (Kristeller), ou pedir para mulher fazer força a fim de o bebê nascer. Dor e edema relacionado ao processo inflamatório.
R2 *- "Ali eu começava uma **luta diária de cicatrização daqueles pontos que me rasgaram de fora a fora"***	Processo de cicatrização extenso e demorado	Cicatrização de sutura extensa e demorada

R2 *- **"foram meses com uma ferida embaixo das minhas pernas. E uma cirurgia plástica depois de 1 ano."***	Alteração na auto imagem sexual	Processo de cicatrização demorado por laceração extensa. Deformidade cicatricial provocada por laceração extensa. Alteração na função fisiológica sexual
R2 *- "Então a doutora teve a brilhante ideia de usar o **"tal famoso fórceps**" que na época já era proibido. Pois bem, **algumas tentativas foram feitas, o barulho daquele objeto batendo um no outro quando escapavam eram horríveis**..."*	Uso do fórceps	Uso do fórceps de forma inapropriada, com risco de dano para o feto e para a mãe.
R1 *- "...**fui induzida ao parto normal, estouraram minha bolsa. Subiram na cama, forçaram minha barriga"***	Indução ao parto Rompimento artificial da bolsa amniótica Manobra de Kristeler	Rompimento artificial da bolsa amniótica como método para acelerar o trabalho de parto. Manobra de empurrar o útero para acelerar a saída do feto.
R1 *- **"pediam pra não fechar os olhos para não desmaiar"***	Palavras de ordem durante o parto	Palavras de ordem interferem nos hormônios do parto
R1 *- "relatei o que estava sentindo, nem fui encaminhada, **me colocaram direto no soro com medicação** e fui pra casa... as dores voltaram... ouvi de outros profissionais que o soro que tinham me dado fez com que ajudasse nessa situação"*	Indução com ocitocina sintética	Aumento e aceleração das contrações pelo uso da ocitocina sintética Dor e desconforto potencializado pelo uso da ocitocina sintética
R3 *- "Quando estava sentindo muita dor comecei a gritar, e a médica veio brigar comigo, **pois ela não era obrigada a ouvir aquilo e me mandou fazer silêncio, senão ela iria embora**"*	Agressão verbal Violência psicológica	Sensação de medo e tensão ocasionam alterações hormonais
R3 *– "o corte para ajudar a passagem do bebê que me rendeu 20 pontos... da vagina até o meio da nádega esquerda... Eu sofri muito com os pontos, demorou muito para "secar", **eu morria de medo de fazer força para evacuar, e fiquei com o intestino preso por alguns dias.***	Episiotomia extensa Dor Medo de eliminar fezes	Alteração no sistema gastrointestinal por medo de eliminar fezes
R4 *– "Foram ao total 7horas em trabalho de parto, **muitos exames de toque e desconforto**"*	Exames de toque excessivos e desconforto	Exposição ao risco de infecção Desconforto

Quadro 1 - Práticas de violência obstétrica identificadas e aspecto biológico relacionado, em que R1, R2, R3 e R4, referem-se ao trecho descrito no relato.

Fonte: Elaborado pela autora.

Relato	Qtd	Intervenções
R1	7	• Indução do parto com ocitocina sintética • Privação alimentar • Rompimento artificial da bolsa amniótica • Manobra de Kristeller • Episiotomia • Palavras de ordem durante o parto • Parto prematuro
R2	10	• Retirada do acompanhante do local de parto • Manobra de Kristeller • Utilização inadequada do fórceps • Hemorragia • Laceração severa • Processo inflamatório no local da laceração • Demorado processo de cicatrização • Dor intensa • Dispareunia • Trauma psicológico
R3	7	• Indução do parto com ocitocina sintética • Agressão verbal e insultos • Manobra de Kristeller • Episiotomia extensa • Edema e cicatrização demorada devido a episiotomia • Ausência do acompanhante pois o hospital não permitiu • Alterações gastrointestinais (constipação) por medo de eliminar as fezes
R4	7	• Indução do parto com ocitocina sintética • Exames de toque excessivos • Rompimento artificial da bolsa amniótica • Posição litotômica • Episiotomia • Dispareunia • Dores e desconforto

Quadro 2 - Amostragem da quantidade de intervenções (VO) sofridas por cada uma das puérperas dos relatos.

Fonte: Elaborado pela autora.

6 I DISCUSSÃO

Nos relatos analisados, foi possível identificar diversos tipos de violência obstétrica, e em todos eles foram observadas mais de uma dessas intervenções na mesma parturiente, conforme apresentado no Quadro 2, o que se relaciona com o descrito no estudo de Nucci, Nakano e Teixeira (2018); quando os autores descrevem o excesso de intervenções como um “efeito cascata”, em que uma intervenção gera problemas que possivelmente serão resolvidos com outra intervenção e assim por diante. Diniz (2009) avalia a assistência ao parto normal no Brasil como excessivamente intervencionista e desnecessariamente traumática, muito distante do processo natural e fisiológico. Cada intervenção isoladamente, pode gerar vários problemas e danos para a parturiente, ou para o bebê, ou ainda para o binômio mãe-bebê.

Em relação a episiotomia, injúria tecidual produzida cirurgicamente entre a mucosa do canal vaginal e períneo, apresentam-se os seguintes trechos dos relatos:

> R1 - "...fizeram um corte..."
>
> R3 - "o corte pra ajudar a passagem do bebê que me rendeu 20 pontos... da vagina até o meio da nádega esquerda...".

Scarabotto e Riesco (2006) afirmam que a ocorrência de lacerações perineais no parto normal depende de diversos fatores, que podem estar relacionados às condições maternas, ao feto, ao parto em si e à própria episiotomia, que é amplamente utilizada para evitar lacerações na região, mas que, por si só, constitui um trauma perineal, por vezes, mais severo que as lacerações espontâneas.

De acordo com Martins-Costa *et al.* (2001) a prática da episiotomia tende a ser abandonada como rotina, em alguns países, índices menores que 20% têm sido obtidos, não há evidências confiáveis de melhores resultados maternos ou perinatais com emprego rotineiro da episiotomia, pelo contrário, sua prática gera riscos.

Entre esses riscos está a infecção puerperal, que segundo Nogueira (2016) pode ocorrer na cavidade uterina ou nas incisões cirúrgicas (feridas operatórias ou de episiotomia), e representam uma das principais complicações cirúrgicas de pós-parto. Fato que condiz com os estudos de Guimarães, Chianca e Oliveira (2007) que dizem que a infecção puerperal ainda representa um grande problema pela sua prevalência, morbidade e até letalidade.

Ternes e Mozzaquatro (1988) perceberam em seus estudos, que um alto número de mulheres apresentou infecções decorrentes da episiotomia, e em alguns casos, em decorrência da infecção apresentaram deiscência (abertura espontânea dos pontos cirúrgicos).

Embora a infecção puerperal não tenha sido apresentada no procedimento de episiotomia, esse risco foi potencializado; e o problema pode observado no relato sobre a laceração, em que a Manobra de Kristeller ocasionou uma injúria tecidual severa no períneo, que por sua vez desencadeou um processo inflamatório doloroso e de difícil cicatrização, de acordo com o seguinte relato:

> R2 - "...precisei de uns 70 pontos. Pois havia uma laceração da vagina ao ânus. Deram anestesia. Fui pro quarto... Mas as dores eram terríveis, tive que fazer compressa com gelo no local dos pontos por dias, porque o lugar inchou muito."

Segundo Nogueira (2016), essa rotura pode ser definida como de 1º, 2º e 3º grau, sendo a última a mais severa pois atinge o esfíncter retal podendo, prolongar-se até a parede anterior do reto. No relato descrito, podemos perceber a laceração de 3º grau conformada também pelo número de aproximadamente 70 pontos.

De acordo com Silva *et al.* (2018) as mulheres acometidas por traumas perineais ficam expostas, no puerpério, a morbidades e alguns sinais e sintomas, a exemplo da dor perineal, dispareunia, sangramento, infecções, edema e hematomas, que poderão comprometer algumas atividades habituais e necessidades fisiológicas, trazendo-lhes

considerável desconforto e afetando a qualidade de vida no pós-parto.

Ainda sobre o relato descrito R2, pode-se dizer que provavelmente a região do canal vaginal e períneo foi muito manipulada, a injúria tecidual expõe a região da mucosa vaginal e do músculo, a infecção e ao processo inflamatório, que provoca dor e edema local.

No mesmo relato R2 descrito acima, a puérpera passou por outra intervenção que foi a utilização do fórceps, ele é instrumento obstétrico utilizado para correções de alterações na descida do feto durante o parto e abreviação do período expulsivo. O relato foi descrito da seguinte forma:

> R2 - "Então a doutora teve a brilhante ideia de usar o "tal famoso fórceps" que na época já era proibido. Pois bem, algumas tentativas foram feitas, o barulho daquele objeto batendo um no outro quando escapavam eram horríveis..."

O fórceps tem seu uso muito restrito por obstetras, sendo fundamental uma capacitação adequada do profissional para sua utilização. Nota-se pelo relato que foram feitas "algumas" tentativas para sua colocação e a mulher sentiu e ouviu o barulho do instrumento.

Nos estudos pesquisados sobre intervenções no parto, o uso do fórceps é citado como causador de uma série de danos, conforme relatam Oliveira *et al.* (2010), o instrumento é citado como fator de risco importante para o trauma perineal e surgimento de incontinência urinária e fecal em puérperas. Para Barbosa *et al.* (2005) o uso do fórceps pode contribuir para o comprometimento das estruturas anatômicas e disfunções miccionais.

Traumas como esse são precursores de dispareunia, que foi assim apresentada no relato a seguir:

> R4 – "minha relação sexual com meu marido nunca mais foi a mesma, sempre tenho desconforto e dores."

Holanda *et al.* (2014) descreve a função sexual como biológica e fisiológica, e o trauma perineal pode trazer a dispareunia, que aparece na maioria dos estudos publicados como uma das principais disfunções sexuais no puerpério, comprometendo o desejo, a satisfação sexual e a frequência das relações sexuais, muito relacionada ao parto normal, pela presença de episiotomia e/ou lacerações, e não é a única disfunção sexual que acomete as mulheres nesse período tão importante de suas vidas.

No que diz respeito à ocitocina, sua utilização foi observada no seguinte relato:

> R1 - "relatei o que estava sentindo, nem fui encaminhada, me colocaram direto no soro com medicação e fui pra casa... as dores voltaram... ouvi de outros profissionais que o soro que tinham me dado tinha fez com que ajudasse nessa situação"
>
> R4 – "Dei entrada 12h com um dedo de dilatação, logo fui colocada no soro e as dores foram intensas..."

Nucci, Nakano e Teixeira (2018) observaram que o uso dessa substância sintetizada, preconiza a realização de outras intervenções, como o aumento no número

de monitoramento dos batimentos fetais, avaliação frequente do processo de dilatação cervical, maior número de exames vaginais ou retais, além da administração de oxigênio para prevenir anóxia fetal durante o trabalho de parto. Essa afirmação condiz com alguns dos relatos apresentados em que após a administração do "soro", a parturiente precisou passar por diversas intervenções, como por exemplo o excesso de exames de toque, até a chegada do bebê.

De acordo com Chaves (2007), a ocitocina é um nonapeptídio sintetizado nos núcleos paraventricular e supraóptico do hipotálamo, que quando liberada centralmente pela neurohipófise atua como um neurotransmissor e neuromodulador de diversos processos, como por exemplo na modulação da ansiedade e na regulação das respostas neuroendócrina e cardiovascular; e quando liberada perifericamente ela age como um hormônio e promove a liberação do leite durante a lactação e a contração uterina no parto.

Esta afirmação também pode ser observada nos estudos de Dacome e Garcia (2008), que demonstram uma forte ligação desse hormônio com emoções básicas como medo, ansiedade, fome, saciedade, prazer e desejo sexual, sendo atribuído a ela o termo "hormônio do amor". A ligação da ocitocina com esse status está amparada nos estudos de Fernández *et al.* (2011), onde observaram que nas horas seguintes ao parto, valores máximos de ocitocina endógena se relacionam no cérebro do recém-nascido, com período sensitivo e início do vínculo materno. Os autores referem ainda, que a manipulação do sistema ocitocinérgico, como por exemplo a administração de ocitocina sintética intraparto ou cesáreas agendadas sem trabalho de parto prévio, podem contribuir para que haja alterações nas respostas sociais e sexuais daquele indivíduo.

Outros recursos utilizados para acelerar o parto são o rompimento artificial da bolsa amniótica e manobra de Kristeller, evidenciada no relato a seguir:

> R1 - "... fui induzida ao parto normal, estouraram minha bolsa. Subiram na cama, forçaram minha barriga"

Segundo os estudos de Souza *et al.* (2010) a bolsa amniótica envolve o feto, e é importante em todo o processo da gestação e no parto, protegendo-o de traumas e infecções. O rompimento da bolsa é utilizado muitas vezes na prática com as mulheres em trabalho de parto para estimular as contrações e acelerar o parto. Acredita-se que ao romper as membranas ocorre a produção e a liberação de prostaglandinas e ocitocina, além de que, com a diminuição da quantidade de líquido amniótico há encurtamento das fibras uterinas, aumentando o rendimento da contratilidade do útero e promovendo a dilatação. No entanto a recomendação é que a bolsa amniótica não seja rompida pelo risco de infecções para o feto.

Sobre a Manobra de Kristeller, manobra de exercer pressão no fundo do útero com a finalidade de acelerar o parto, Pereira *et al.* (2016) dizem que há um desrespeito ao tempo fisiológico do parto e que na maioria das vezes são resultados da impaciência dos

profissionais. Vários estudos apontam os riscos dessa manobra tanto para o feto quanto para a gestante, Leal (2014) descreve que sobre a pressão que é exercida no fundo uterino não há evidências de ser benéfica. Os riscos potenciais do uso da manobra incluem rotura uterina, lesão do esfíncter anal, fraturas no recém-nascido e danos cerebrais.

No que diz respeito a hemorragia no pós-parto (HPP), apresenta-se o seguinte relato:

> R2 - "E deparei com aquela cena de terror, o avental da médica estava todo ensanguentado, o chão parecia que tinha chovido sangue, uma cena muito feia"

Moraes *et al.* (2009) relatam que HPP é o sangramento excessivo que provoca sintomas como: vertigem, hipotensão, taquicardia, fadiga, anemia, necessidade de hemotransfusão, redução da lactação, Síndrome de Sheehan, isquemia miocárdica e complicações de tratamento cirúrgico. O sangramento é considerado excessivo quando no parto normal é maior que 500ml, e no parto cesárea maior de 1000ml. Pode ser caracterizada como primária, quando ocorre nas primeiras 24 horas após o parto, ou secundária ou tardia quando ocorre entre 24 horas e seis semanas após o parto. Constitui a complicação obstétrica com o maior índice de mortalidade do mundo, responsável por 25 a 30% de todos os óbitos maternos.

Fato que condiz com os estudos de Cecatti *et al.* (2015), que apresentou a hemorragia e a infecção como as complicações maternas mais relatada pelas puérperas, e com o trabalho de Carreno, Bonilha e Costa (2011), que apresentou a hemorragia e a hipertensão como as maiores causas diretas de mortalidade materna. Costa *et al.* (2010), afirmam que a principal causa da HPP é a atonia uterina, mas que também pode ocorrer devido a lacerações, ruptura uterina e distúrbios de coagulação, e assim como os outros autores a descreve como emergência obstétrica de grande risco para a vida da puérpera.

Atrelado a essa questão Silva (2013) também ressalta a necessidade de uma boa preparação psicológica da gestante, durante o pré-natal, para que no momento do parto haja uma diminuição da tríade medo-tensão-dor. A dor é um fenômeno sensorial, porém a ansiedade e a tensão geram um aumento na resposta do sistema nervoso a dor, o que segundo Freddi (1973) influência na tensão muscular, afetando o colo do útero e dificultando a dilatação.

Procedimentos como agressões verbais, insultos e palavras de ordem podem influenciar nesse aumento da tensão, e essas situações foram identificadas no relato:

> R1 - "pediam pra não fechar os olhos para não desmaiar"

> R3 - "Quando estava sentindo muita dor comecei a gritar, e a médica veio brigar comigo, pois ela não era obrigada a ouvir aquilo e me mandou fazer silêncio, senão ela iria embora"

De acordo com Pereira, Cecatti e Oliveira (1998), uma resposta intensa a dor pode ocasionar diversas consequências como: estimulação respiratória, circulatória, de centros

hipotalâmicos de função neuroendócrina predominantemente simpática, de estruturas límbicas e de mecanismos psicodinâmicos de ansiedade e apreensão. O aumento no consumo de oxigênio e a alteração no intervalo das contrações, eleva o pH arterial materno, diminui seu estímulo ventilatório e isso pode causar hipoxemia no feto, assim como desacelerar sua frequência cardíaca.

7 I CONCLUSÃO

Embora não sejam frequentes estudos sobre a violência obstétrica e sua relação com a biologia, a análise dos relatos de experiência das mulheres, em conjunto com a revisão de bibliografias permitiu elaborar uma grande ligação entre os eventos da gestação e parto, bem como das violências obstétricas neles realizadas, com aspectos biológicos.

Pode-se observar que, o próprio trabalho de parto está interligado com diversos fatores biológicos como influência hormonal, alterações biofísicas, alterações químicas, entre outros, e que intervenções inapropriadas acerca desses eventos naturais trazem consequências ao processo do parto, bem como ao binômio mãe-bebê.

Com base nos objetivos propostos, percebeu-se que a violência obstétrica altera o processo natural do parto, o que ocasiona danos de natureza biológica como hemorragias, infecções, inflamações, processos dolorosos de cicatrização, deformidade cicatricial, edema, injúrias teciduais, danos psicológicos, alteração hormonal, aumento nos níveis de dor, alterações gastrointestinais, prejuízos à autoimagem e relação sexual das parturientes envolvidas, e riscos ao recém-nascido.

Percebeu-se também que as intervenções no parto, alteram sua fisiologia natural fazem com que mulheres sofram danos, com resultados que vão interferir em vários aspectos de sua vida.

O estudo possibilitou ainda entender o quanto a biologia está presente no parto e nas alterações ocorridas em função da violência obstétrica, além da reflexão da importância do conhecimento biológico de todo esse processo.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA N. A. M.; SILVEIRA, N. A.; BACHION, M. M.; SOUSA, J. T. **Concentração plasmática do hormônio adrenocorticotrófico de parturientes submetidas a método não farmacológico de alívio da ansiedade e dor do parto**. Rev. Latino-Am. Enfermagem. v. 13. nº 2. Ribeirão Preto. 2005.

ALMEIDA N. A. M.; SOARES, L. J.; SODRÉ, R. L. R.; MEDEIROS, M. **A dor do parto na literatura científica da Enfermagem e áreas correlatas indexada entre 1980-2007**. Rev. Eletr. Enf. v. 10. nº 4. 2008.

BALAREZ, L. G.; BRANCO, L. L. C.; GUTIERRES, L. L. B. **Estudo sobre a realização da episiotomia: Reflexões e implicações na vida da mulher portovelhense**. Centro Universitário São Lucas. Porto Velho/RO. 2018.

BARBIERI, M., et al. **Banho quente de aspersão, exercícios perineais com bola suíça e dor no trabalho de parto**. Acta Paul. Enferm. v. 26. nº 5. São Paulo. 2013.

BARBOSA, A. M. P, et al. **Efeito da via de parto sobre a força muscular do assoalho pélvico**. Rev Bras Ginecol Obstet. p. 677- 682. 2005.

CARRENO, I.; BONILHA A. L. L.; COSTA, J. S. D. **Perfil epidemiológico das mortes maternas ocorridas no Rio Grande do Sul, Brasil: 2004-2007**. Revista Brasileira de Epidemiologia. Rio Grande do Sul. 2011.

CARVALHO, L. C. V. **Os efeitos da Manobra de Kristeller no segundo período de trabalho de parto.** Esc. Sup. Enf. De Porto. Porto. 2014.

CECATTI, J. G., et al. **Maternal near miss among women using the public health system in the Amazon and Northeast regions of Brazil**. Rev Panamericana de Salud Pública. 2015.

CHAVES, D. I. **Efeito da ocitocina sobre a ansiedade experimental induzida em voluntários saudáveis**. Universidade de São Paulo. 2007.

CONITEC. **Diretriz Nacional de Assistência ao Parto Normal**. Relatório de Recomendação. Janeiro/2016.

COSTA, A. S. M., et al. **Hemorragia pós parto: relato de caso de atonia uterina e laceração em puérpera jovem**. Rev Med Minas Gerais. p. 124-127. Minas Gerais. 2010.

CRIZÓSTOMO, C. D.; NERY, I. S.; LUZ, M. H. B. **A vivência de mulheres no parto domiciliar e hospitalar.** Escola Anna Nery. v. 11. nº 1. Rio de Janeiro. 2007.

DACOME, O. A.; GARCIA, R. F. **Efeito modulador da ocitocina sobre o prazer.** Revista Saúde e Pesquisa. v. 1. n. 2. p. 193-200. 2008.

DINIZ, S. G. **Gênero, saúde materna e o paradoxo perinatal**. Rev Bras Crescimento Desenvolv Hum. v. 19. p. 313 - 326. 2009.

DINIZ, S. G., et al. **Violência obstétrica como questão para a saúde pública no Brasil: origens, definições, tipologia, impactos sobre a saúde materna, e propostas para a sua prevenção**. Journal of Human Growth and Development. p. 377-476. São Paulo. 2015.

FERNÁNDEZ, I. O.; GABRIEL, M. A. M.; SÁNCHEZ, F. L.; MARTÍNEZ, A. M. M. **Oxitocina y autismo: una hipótesis para investigar. ¿La alteración de la producción de oxitocina endógena en torno al parto puede estar involucrada en la etiología del autismo?** Revista de Psiquiatría y Salud Mental. v. 4. p. 38-41. Espanha. 2011.

FERREIRA, M. S. **Pisando em óvulos – A violência obstétrica como uma punição sexual às mulheres.** Universidade Federal de Goiás. Goiânia. 2019.

FONSECA, D. H.; RIBEIRO, C. G.; LEAL, N. S. B. **Violência doméstica contra a mulher: realidades e representações sociais**. Piscol. Soc. v. 24. nº 2. Belo Horizonte. 2012.

FREDDI, W. E. S. **Preparo da gestante para o parto.** Revista Brasileira de Enfermagem. 1973.

FRIGO, J., et al. **Episiotomia: (Des)conhecimento sobre o procedimento sob a ótica da mulher**. Brazilian Journal of Sugery and Clinical Research. v. 6. nº2. p.5-10. Santa Catarina. 2014.

GUIMARÃES, E. E. R.; CHIANCA, T. C. M.; OLIVEIRA, A. C. **Infecção puerperal sob a ótica da assistência humanizada ao parto em maternidade pública**. Rev Latino-am Enfermagem. 2007.

HOLANDA, J. B. L., et al. **Disfunção sexual e fatores associados relatados no período pós-parto**. Acta Paul. Enferm. v. 27. n. 6. São Paulo. 2014.

LEAL, M. C., et al**. Nascer no Brasil: inquérito nacional sobre parto e nascimento**. ENSP/Fiocruz. Rio de Janeiro. 2012.

LEAL, M. C., et al. **Intervenções obstétricas durante o trabalho de parto e parto em mulheres brasileiras de risco habitual**. Cad. Saúde Pública. Rio de Janeiro. 2014.

LIMA, G. A. F.; LOPES, M. C. A. **Violência obstétrica: Riscos do uso da Manobra de Kristeller durante o parto**. Uniceplac. Gama/DF. 2019.

MALDONADO, M. T. P. **Psicologia da Gravidez, parto e puerpério**. Vozes. Petrópolis. 1976.

MARCACINE, K. O., et al. **Intimate partner violence among postpartum women: associated factors.** Revista Brasileira de Enfermagem. v. 71. Brasília. 2018.

MARTINS-COSTA, S.R., et al. **Episiotomia: o que há de verdade neste tradicional procedimento?** Femina. p. 201-204. 2001.

MAZZALI, L.; GONÇALVES, R. N. **Análise do tratamento fisioterapêutico na diminuição da dor durante o trabalho de parto normal**. Ensaios e Ciência: C. Biológicas, Agrárias e de Saúde. v. 12. nº 1. Campo Grande. 2008.

MORAES, D. N., et al. **Hemorragia Pós-parto**. Rev Med Minas Gerais. P. 34-37. Minas Gerais. 2009.

NILSEN, E.; SABATINO, H.; LOPES, M. H. B. M. **Dor e comportamento de mulheres durante o trabalho de parto e parto em diferentes posições**. Rev. Esc. de Enferm. v. 45. nº 3. São Paulo. 2011.

NOGUEIRA, G. L**. Infecção puerperal no parto normal**. Faculdade Método de São Paulo. São Paulo. 2016.

NUCCI, M.; NAKANO, A. R.; TEIXEIRA, L. A. **Ocitocina sintética e a aceleração do parto: reflexões sobre a síntese e o início do uso da ocitocina em obstetrícia no Brasil**. Hist. Cienc. Saúde. v. 25. nº 4. Rio de Janeiro. 2018.

OLIVEIRA, E., et al. **Avaliação da ocorrência de fatores relacionados à incontinência urinária feminina.** Rev Assoc Med Bras. p. 688 - 690. 2010.

PEREIRA, L. R., et al. **Parto normal e intervenções ocorridas em uma maternidade pública**. Rev. Baiana Enferm. v. 33. 2019.

PEREIRA, J. S., et al. **Violência obstétrica: ofensa a dignidade humana**. Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research, v. 1. p. 103-108. 2016.

PEREIRA, R. I. C.; CECATTI, J. G.; OLIVEIRA, A. S. **Dor no trabalho de parto: fisiologia e o papel da analgesia peridural**. Rev Ciênc Méd Campinas. p. 79-84. Campinas. 1998.

PICCININI, C. A., et al. **Gestação e a constituição da maternidade**. Psicologia em Estudo. v. 13, n. 1, p. 63 – 72. Maringá. 2008.

Rede Parto do Princípio - Mulheres em Rede pela Maternidade Ativa. **Dossiê da Violência Obstétrica "Parirás com dor"**. Elaborado para a CPMI Violência contra as Mulheres. 2012.

RUSSO, J. A.; NUCCI, M. F. **Parindo no paraíso: parto humanizado, ocitocina e a produção corporal de uma nova maternidade**. Interface. São Paulo. 2020.

SALGE, A. K. M., et al. **Prática da episiotomia e fatores maternos e neonatais relacionados.** Rev. Eletr. Enf. Goiânia/GO. 2012.

SCARABOTTO, L. B.; RIESCO, M. L. G. **Fatores relacionados ao trauma perineal no parto normal em nulíparas.** Rev. Esc. Enferm. USP. v. 40. n. 3. São Paulo. 2006.

SCHNECK, C. A.; RIESCO, M. L. G. **Intervenções no parto de mulheres atendidas em um centro de parto normal intra-hospitalar**. Rev. Mineira de Enfermagem. v. 10. Minas Gerais. 2006.

SERRA, M. C. M. **Violência obstétrica em (des)foco: uma avaliação da atuação do judiciário sob a ótica do TJMA, STF e STJ**. Universidade Federal do Maranhão. São Luís. 2018.

SILVA, A. M. N., et al. **Caracterização da dor decorrente de traumas perineais em mulheres com parto vaginal**. BrJP. v. 1. n. 2. São Paulo. 2018.

SILVA, E. A. T. **Gestação e preparo para o parto: programas de intervenção**. O Mundo da Saúde. p. 208 – 215. São Paulo/SP. 2013.

SOUZA, A. S. R. **Análise crítica dos métodos não-farmacológicos de indução do trabalho de parto.** Femina. vol. 38. n. 4. São Paulo. 2010.

TERNES, M. F.; MOZZAQUATRO, R. A. P. **Complicações da episiotomia no puerpério imediato.** Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 1988.

TESSER C. D.; KNOBEL R.; AND6REZZO H. F. A.; DINIZ S. D. **Violência obstétrica e prevenção quaternária: o que é e o que fazer.** Rev Bras Med Fam Comunidade. p. 1-12. Rio de Janeiro. 2015.

WOLFF, L. R.; WALDOW, V. R. **Violência Consentida: mulheres em trabalho de parto e parto**. Saúde e Soc. São Paulo. v. 17, nº. 3, p. 138 - 151. São Paulo. 2008.

ZANARDO, G. L. P.; URIBE, M. C.; NADAL, A. H. R.; HABIGZANG, L. F. **Violência obstétrica no Brasil: Uma revisão narrativa**. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre/RS. 2017.

CAPÍTULO 6

Baccharis milleflora (LESS.) D.C.: EFEITOS CONTRA FUNGOS OPORTUNISTAS E FATOR DE VIRULÊNCIA

Data de aceite: 26/05/2021
Data de submissão: 07/04/2021

Henrique Douglas Melo Coutinho
Universidade Regional do Cariri – URCA
Crato – CE
http://lattes.cnpq.br/3199766197573928

Ana Lays Braga
Universidade Regional do Cariri – URCA
Crato – CE
http://lattes.cnpq.br/1253747031699243

Rafael Pereira da Cruz
Universidade Regional do Cariri – URCA
Crato – CE
http://lattes.cnpq.br/3675589918865790

Joara Nályda Pereira Carneiro
Universidade Regional do Cariri – URCA
Crato - CE
http://lattes.cnpq.br/6852258984414550

Antonia Thassya Lucas dos Santos
Universidade Regional do Cariri – URCA
Crato – CE
http://lattes.cnpq.br/4758519850222411

Débora Lima Sales
Universidade Regional do Cariri – URCA
Crato – CE
http://lattes.cnpq.br/7312046927599488

Victor Juno Alencar Fonseca
Universidade Regional do Cariri – URCA
Crato – CE
http://lattes.cnpq.br/7456639999894976

Luciene Ferreira de Lima
Universidade Regional do Cariri – URCA
Crato – CE
http://lattes.cnpq.br/8238587720435802

Luiz Everson da Silva
Universidade Federal do Paraná – UFPR
Matinhos - PR
http://lattes.cnpq.br/4038338525106985

Maria Flaviana Bezerra Morais-Braga
Universidade Regional do Cariri – URCA
Crato – CE
http://lattes.cnpq.br/1557613482101211

Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues
Universidade Regional do Cariri – URCA
Crato – CE
http://lattes.cnpq.br/5902756093532709

RESUMO: Os óleos essenciais de espécies vegetais podem apresentar diversas atividades biológicas, considerando sua variedade de componentes químicos. A busca por alternativas naturais para tratamento de infecções fúngicas vem sendo explorada tendo em vista a resistência microbiana. Este trabalho objetivou analisar a atividade antifúngica do óleo essencial das folhas de *Baccharis milleflora* L. frente a *Candida albicans* (CA) e *Candida tropicalis* (CT). A atividade antifúngica foi investigada pelo método de microdiluição em caldo, sendo o óleo avaliado sozinho e em combinação com o fármaco fluconazol. Os dados foram analisados através do programa *Graphpad Prism*, v. 7.0. A Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi determinada por subcultivo em placas de *Petri.*

Efeitos na transição morfológica fúngica foram analisados por microcultivo das cepas em câmara úmida. Os testes antifúngicos do produto isolado não apresentaram ação clinicamente relevante. Porém a associação com o fármaco demonstrou sinergismo frente a *C. tropicalis.* O óleo apresentou efeito fungicida na concentração de 2.048 μg/mL frente a CA e efeito fungistático contra CT. A ação do óleo essencial sobre o fator de virulência, a transição morfológica, demonstrou inibição total do surgimento de estruturas filamentosas invasivas nas linhagens padrão e isolado clínico de *C. albicans*. Frente a *C. tropicalis* provocou inibição total para a linhagem padrão e porcentagens de inibição nas concentrações CFM/2 – 88,6 %, CFM/4 – 52,6 % e CFM/8 – 48,6 %, para isolado clínico foram obtidas. O óleo essencial de *Baccharis milleflora* pode contribuir para inibição de um dos mais importantes fatores de virulência de *C. albicans* e *C. tropicalis*, sendo necessários estudos que evidenciem os mecanismos específicos desta ação.
PALAVRAS-CHAVE: Astaraceae; sinergismo; anti-pleomorfismo; anti-*Candida.*

Baccharis milleflora (LESS.) D.C.: EFFECTS AGAINST OPPORTUNISTIC FUNGI AND VIRULENCE FACTOR

ABSTRACT: Essential oils of plant species can have several biological activities, considering their variety of chemical components. The search for natural alternatives to treat fungal infections has been explored with a view to microbial resistance. This work aimed to analyze the antifungal activity of the essential oil of *Baccharis milleflora* L. leaves against *Candida albicans* (CA) and *Candida tropicalis* (CT). The antifungal activity was investigated by the broth microdilution method, the oil being evaluated alone and in combination with the drug fluconazole. The data were analyzed using the Graphpad Prism program, v. 7.0. The Minimum Fungicide Concentration (CFM) was determined by subculture in Petri dishes. Effects on the fungal morphological transition were analyzed by microculture of the strains in a humid chamber. The antifungal tests of the isolated product did not present a clinically relevant action. However, the association with the drug showed synergism against *C. tropicalis*. The oil had a fungicidal effect at a concentration of 2,048 μg / mL against CA and a fungistatic effect against CT. The action of essential oil on the virulence factor, the morphological transition, demonstrated total inhibition of the appearance of invasive filamentous structures in the standard strains and clinical isolate of *C. albicans.* Against *C. tropicalis* it caused total inhibition for the standard strain and percentages of inhibition in the concentrations CFM / 2 - 88.6%, CFM / 4 - 52.6% and CFM / 8 - 48.6%, for clinical isolate were obtained. The essential oil of *Baccharis milleflora* can contribute to the inhibition of one of the most important virulence factors of *C. albicans* and *C. tropicalis*, being necessary studies that show the specific mechanisms of this action.
KEYWORDS: Astaraceae; synergism; anti-pleomorphism; anti-*Candida*.

1 I INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e pesquisa de moléculas com potencial terapêutico para uso contra micro-organismos patogênicos tem tido lugar de destaque em estudos com vegetais, pois estes podem apresentar propriedades intrínsecas, com ação antimicrobiana (SWAMY; AKHTAR; SINNIAH, 2016). As plantas obtêm substâncias que são essenciais para sua

sobrevivência por meio da fotossíntese, e o processo que envolve a síntese destes compostos é o metabolismo primário dos vegetais. A partir da síntese deste processo, advém uma ampla variedade de derivados, que são denominados metabólitos secundários, que inclui uma ampla variedade de componentes (ESQUINCA; MORENO, 2017).

Os óleos essenciais são uma mistura complexa de diversos compostos orgânicos voláteis e hidrofóbicos, advindos do metabolismo secundário dos vegetais e são uma mistura complexa de várias classes de compostos químicos, que podem ser encontrados em diversas partes dos vegetais, normalmente a constituição química pode variar em plantas da mesma espécie, a depender da região da planta a ser realizada a extração do produto natural. As classes de compostos químicos encontrada com mais frequência nos óleos essenciais, incluem fenilpropanóides, monoterpenos e sesquiterpenos (DEL QUIQUI et al., 2019; WANI et al., 2020).

Os constituintes químicos de óleos essenciais apresentam uma ampla variedade biológica, incluindo atividade antimicrobiana, podendo interferir no crescimento fúngico, com uma variedade de alvos de ação especialmente sobre a membrana e citoplasma de micro-organismos, podendo alterar completamente a morfologia das células (SANTOS; PICCOLI; TEBALDI, 2017; FLORES VILLA et al., 2020).

O aumento da resistência aos antimicrobianos já existentes, justificam as pesquisas por fontes alternativas de tratamento, diversas espécies de vegetais têm apresentado potencial antimicrobiano promissor, sendo alvo de estudos que visam avaliar os possíveis compostos com eficácia contra os micro-organismos resistentes e que tenham baixa toxicidade para o hospedeiro (BONI et al., 2017). Os fungos são patógenos associados a infecções de difícil tratamento no organismo humano, fungos da espécie *Candida* são descritos como micro-organismos oportunistas, pois estão presentes no organismo humano de forma comensal, porém mediante condições de queda da imunidade apresentam aumento da patogenicidade e potencial invasor dos tecidos do hospedeiro (SEYOUM *et al.*, 2020; SHAHABUDIN; AZMI, 2020).

A manifestação cada vez mais frequente de infecções fúngicas, ocorre simultaneamente à resistência elevada a agentes antimicrobianos, dessa forma é necessário a identificação de novos agentes terapêuticos e desenvolvimento de novas formulações, diante deste contexto, os produtos naturais destacam-se como uma fonte de estudo e pesquisa, mediante a possível atividade antimicrobiana presente nos derivados do metabolismo secundário (SILVA *et al,* 2019).

Espécies do gênero *Baccharis* são utilizadas na medicina popular para tratamento de várias doenças, e estão sendo estudadas, devido apresentar diversos metabólitos secundários, sendo consideradas importantes fontes de novos compostos ativos (MORAIS; CASTANHA, 2011). O referido gênero apresenta-se como o mais numeroso dentro da família Asteraceae, com ocorrência na América, é nativo do Brasil com predomínio na região Sudeste apresenta-se na forma de arbusto, subarbusto, árvore ou trepadeira tendo

em torno de 179 espécies (HEIDEN, 2015).

A espécie *Baccharis milleflora* (Less.) D.C. é popularmente conhecida como carqueja-do-lajeado e ocorre nas regiões sul e sudeste do Brasil, crescendo como arbustos eretos e glabros, que formam populações densas especialmente em solos rasos e úmidos, sendo eventualmente utilizada na medicina popular como antidiurético e anti-inflamatório (HEIDEN, 2015).

Este estudo objetivou avaliar o efeito antifúngico do óleo essencial das folhas de *Bacharis milleflora,* intrínseco e combinado a fármaco, na inibição do crescimento e da virulência de leveduras patogênicas oportunistas de *Candida albicans* e *Candida tropicalis.*

2 I MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta do Material Vegetal

A coleta do material vegetal para extração do óleo essencial foi realizada no município de Piraquara. Os espécimes foram localizados no campo, com as coordenadas: latitude 25º32' S, longitude 49º03' W e altitude 985 (Figura 1). Logo após foram transportadas para o Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba e Herbário das Faculdades Integradas do Museu Botânico Municipal de Curitiba onde foram preparadas exsicatas e herborizadas com o número HFIE 8.920 (LAWRENCE, 1951; IBGE, 1992).

Figura 1. Partes aéreas da espécie *Baccharis milleflora*.

Fonte: Wanderlei do Amaral.

2.2 Extração do Óleo Essencial

A extração do óleo essencial foi realizada por hidrodestilação durante 2,5 horas em aparelho graduado tipo Clevenger utilizando-se 50g de folhas secas em 1L de água destilada, com 3 repetições para minimizar erro experimental e homogeinizar as amostras (WASICKY, 1963). Para secar as folhas utilizou-se secador elétrico modelo FANEM - Mod. 320 SE com circulação de ar a 40º C por 24 horas. Para determinação do teor de umidade das folhas frescas no momento da extração foram coletadas amostras de 20g em triplicatas, submetidas à secagem em secador elétrico modelo FANEM - Mod. 320 SE com circulação de ar a 65ºC até atingir peso constante. Após a extração, as amostras foram coletadas com pipeta de precisão e armazenadas em freezer para posterior análise.

2.3 Cepas Fúngicas

Foram utilizados fungos padrão e isolados clínicos das espécies *Candida albicans* e *Candida tropicalis* obtidos da Coleção de Culturas Oswaldo Cruz do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde INCQS, e da Micoteca URM (University Recife Mycology) da Universidade Federal de Pernambuco.

2.4 Preparo dos Inóculos

Em um primeiro momento as referidas linhagens foram cultivadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura (Ágar Sabourand Dextrose - ASD) para fungos e após um período de 24 horas na estufa foram mantidas sob refrigeração a 37 °C. Os inóculos foram preparados em Placas de *Petri*, contendo 25 mL de ASD a 37 °C por 24 horas. Amostras foram preparadas em tubos de ensaio contendo 0,3 mL de solução salina a 0,9 % estéril, tendo sua turbidez comparada segundo escala de McFarland (NCCLS, 2002).

2.5 Drogas de Referência

Foi utilizado o antifúngico Fluconazol, sendo diluído em água estéril e destilada, na concentração inicial de 4.096 μg/mL.

2.6 Determinação da Curva de Viabilidade Celular e Concentração Inibitória de 50 % - CI_{50}

Foram preparados em *eppendorfs* 1.500 μL de solução, sendo 1.350 μL do meio de cultura e 150 μL do inóculo. Em seguida foi realizada a técnica de microdiluição em uma placa com 96 poços, sendo adicionado 100 μL da solução inicial em cada poço, logo após foi realizada a microdiluição do óleo essencial com concentração no primeiro poço de 2.048 μg/mL e 2 μg/mL no penúltimo, o último poço para controle de crescimento.

Logo em seguida as placas foram mantidas na incubadora a 37 °C por 24 horas. Para a leitura, utilizou-se espectrofotometria no aparelho de ELISA (Termoplate ®), onde os

dados obtidos foram trabalhados estatisticamente para gerar a curva de viabilidade celular e a $CI_{50.}$ Foram preparados controle de diluição e de esterilidade do meio (MORAIS-BRAGA et al., 2016).

2.7 Determinação da Concentração Fungicida Mínima - CFM

Este teste foi utilizado para analisar a viabilidade fúngica após contato com o óleo na microdiluição. Seguiu-se a metodologia proposta por Ernest et al (1999), com modificações. A partir do teste da CIM foi homogeneizado o meio contido em cada poço com haste estéril sendo subcultivado em Placa de *Petri* contendo meio de cultura ASD (*Sabourand Dextrose Agar*). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas onde verificou-se o crescimento ou supressão de colônias fúngicas.

2.8 Verificação do Efeito Combinado do Óleo Essencial com Fármacos

Para este teste foi trabalhada a concentração subinibitória do óleo essencial com CFM/16 conforme proposto por Coutinho et al. (2008), com modificações. A solução contida nos tubos *eppendorfs* (produto natural + meio de cultura + inóculo) foi adicionada a cada poço de uma placa com 96 poços, sendo 100 μL em cada um deles, em seguida foi feita a microdiluição com 100 μL do fármaco de referência. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Para a leitura do teste foi realizada em aparelho de espectrofotometria de ELISA (Termoplate®) e os resultados foram utilizados para obtenção de uma curva de viabilidade celular e IC_{50}. Foram preparados controle de crescimento, de diluição do óleo e de esterilidade do meio (MORAIS-BRAGA et al., 2016).

2.9 Avaliação do Efeito Sobre a Virulência Fúngica

Para verificar a ação do produto natural sobre um dos fatores de virulência fúngica, a formação de hifas/pseudohifas, foram montadas câmaras úmidas estéreis para observação das leveduras. Dentro de câmaras úmidas, sobre uma lâmina de microscopia (estéril) foram vertidos 3 mL de solução contendo meio de cultura e óleo essencial, nas concentrações CFM/2, CFM/4 e CFM/8. Após solidificação do meio foram traçadas duas estrias paralelas captadas do inóculo previamente preparado, logo após foi coberta com lamínula estéril. As câmaras em seguida foram levadas à incubadora e após 24 h (37 °C) onde após esse período ocorreu à visualização do cultivo em microscopia óptica (AXIO IMAGER M2 – 3525001980 – ZEISS - Germany) utilizando objetiva de 40 vezes. Foi contornada toda a estria verificando se houve emissão ou inibição de hifas. Uma câmera fotográfica foi acoplada ao microscópio para captura de imagens. As imagens capturadas foram analisadas mediante a medição de hifas utilizando-se de *Software The Zen* 2.0 (CARNEIRO et al., 2019). Foi realizado controle para crescimento de leveduras.

2.10 Análise Estatística

Os dados obtidos pela leitura espectrofotométrica foram verificados quanto a sua distribuição normal e em seguida analisados por ANOVA de uma via por meio do teste post hoc de Tukey, usando o software *Graphpad Prism*, v. 7.0.

3 I RESULTADOS E DISCUSSÕES

A atividade antifúngica do óleo essencial foi estabelecida a partir da curva de viabilidade celular para a ação intrínseca do óleo essencial e mediante associação com fluconazol. A ação do óleo essencial demonstrou inibição de crescimento nas concentrações de 1024*µ*g/mL para CA INCQS 40006 e de 128 *µ*g/mL para CA URM 4127. Para cepas de *Candida tropicalis* a inibição de crescimento ocorreu na concentração de 2.048 *µ*g/mL (Figura 2).

A associação do produto natural com o fluconazol, resultou em curva de inibição de crescimento semelhante à curva do fármaco sozinho frente a cepas CA INCQS 40006 e CA URM 4127. Para cepas CT INCQS 40042 e CT URM 4262, a associação resultou em possível sinergismo, com efeito de inibição de crescimento em menores concentrações quando comparadas a ação do fármaco sozinho.

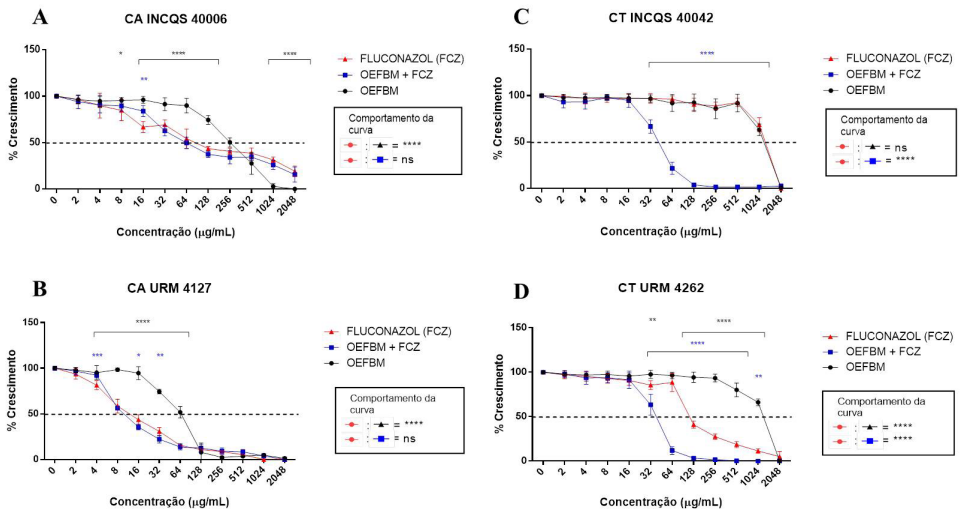


Figura 2: **A e B** Ação antifúngica do fluconazol (FCZ) associado ao OEBM (óleo essencial das folhas de *Bacharis milleflora*) contra estirpes de *C. albicans* (CA). INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; URM: *University Recife Mycology*. Universidade Federal de Pernambuco. **C e D** Ação antifúngica do fluconazol (FCZ), associado ao OEBM (óleo essencial de *Baccharis milleflora*) contra estirpes de *C. tropicalis* (CT). INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; URM: *University Recife Mycology*. Universidade Federal de Pernambuco

Em relação a concentração necessária para inibir 50 % das células fúngicas, a Tabela 1 demonstra melhor resultado para associação do óleo essencial e fluconazol em relação a ação isolada do fármaco, frente a todas as cepas testadas.

	CA INCQS 40006	**CA URM 4127**	**CT INCQS 40042**	**CT URM 4262**
OEBM	275.08	59.05	1322.4	1241.02
FLUCONAZOL	90.71	12.10	1421.6	131.58
OEBM + FCZ	63.55	10.92	40.53	34.35

CA: *Candida albicans*; CT: *Candida tropicalis*; FCZ: Fluconazol; OEBM – Óleo essencial de *Baccharis milleflora*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; URM: University Recife Mycology. Universidade Federal de Pernambuco.

Tabela 1. Concentração capaz de inibir 50% da população fúngica (IC50) (µg/mL) do óleo essencial de *Baccharis milleflora* frente a diferentes estirpes de *Candida*

Neste teste foi observado o efeito do produto natural e fármaco, combinados e sozinhos, se foi fungicida ou fungistático nas concentrações avaliadas. Para as cepas de *C. albicans* houve inviabilização de crescimento na concentração de 2.048 µg/mL (efeito fungicida) e para as cepas de *C. tropicalis* os valores de CFM foram ≥ 4096 µg/mL (efeito fungistático no ensaio).

Os gráficos abaixo (Figura 3 A, B, C, D) evidenciam a ação do óleo essencial sobre um dos mecanismos de virulência de espécies de *Candida*, que se refere à transição morfológica para formação de hifas e pseudohifas. É possível observar que a ação do óleo essencial inibiu completamente a formação de estruturas filamentosas frente a cepas de *Candida albicans.* A inibição total também ocorreu para linhagem de CT INCQS 40042, para CT URM 4262 as porcentagens de inibição foram para CFM/2 – 88,6 %, CFM/4 – 52,6 % e CFM/8 – 48,6 %.

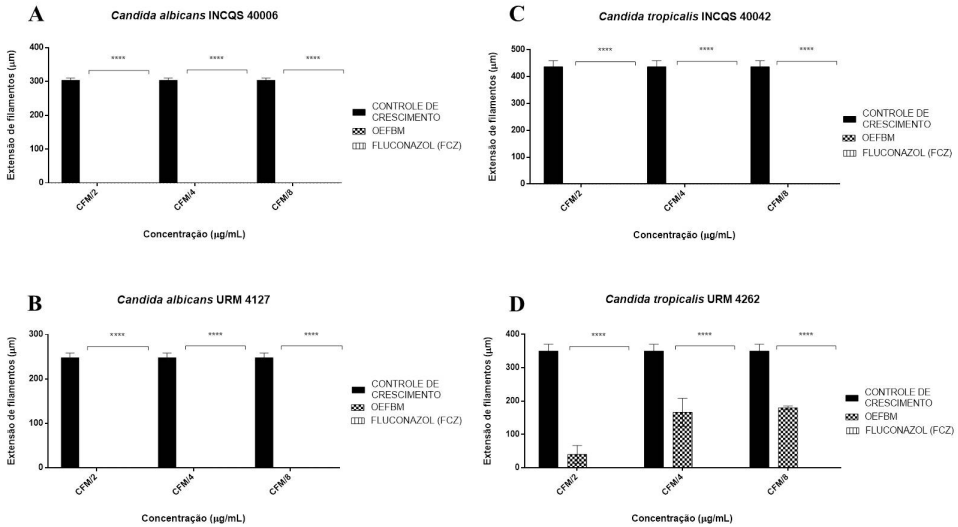


Figura 3: **A e B** Efeito inibitório do antifúngico fluconazol e do óleo essencial de *Bacharis milleflora* (EOLBM) sobre o crescimento micelial de estirpes de *C. albicans*. INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; URM: *University Recife Mycology*. Universidade Federal de Pernambuco. **C e D** Efeito inibitório do antifúngico fluconazol e do óleo essencial de *Bacharis milleflora* (OEBM) sobre o crescimento micelial de estirpes de *C. tropicalis* (CT). INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; URM: *University Recife Mycology*. Universidade Federal de Pernambuco.

Óleos essenciais têm composição química complexa, devido a presença de muitas substâncias (REHAMN, et al., 2016), A amostra utilizada nesse estudo foi quimicamente avaliada por Do Amaral e colaboradores (2019), sendo possível detectar 50,6% de constituintes químicos, onde o composto majoritário foi o Viridiflorol, (18,6 %) seguido de Cis-beta-guaieno+biciclogermanecrene, (4,7 %) e Epi-alfa-muurolol, (3,3 %). Cada composto foi identificado mediante comparação de seus espectros de massas com aqueles das espectrotecas (Wiley, 1994) e por seus índices de retenção linear, calculados a partir da injeção de uma série homóloga de hidrocarbonetos (C_7-C_{26}) e comparados com dados da literatura (ADAMS, 2007).

Estudos acerca da composição química de *B. milleflora* demonstram a ocorrência de compostos químicos terpenos, especialmente monoterpenos e sesquiterpenos (AGOSTINI et al., 2005; MORAIS; CASTANHA, 2011; PEREIRA et al., 2017; TROMBIN- SOUZA et al., 2017).

Os compostos voláteis da espécie *B. milleflora* apresentam alta instabilidade em relação aos seus componentes químicos (BESTEN et al., 2014). Em estudo sobre o óleo essencial de folhas da referida espécie Agostini et al., (2005) encontraram diferenças na composição química de três amostras coletadas na mesma hora e local, obtendo como composto majoritário espatulenol em duas amostras e β – pineno na terceira amostra, tal ocorrência pode ser atribuída a presença de diferentes quimiotipos na espécie. Os

compostos encontrados nas três amostras foram diferentes dos encontrados neste estudo que obteve viridiflorol (18,6 %) em maior quantidade quando comparados aos demais, seguido de *Cis*-beta-guaieno + biciclogermacreno (4,7 %).

Compostos sesquiterpenos foram descritos como majoritários no óleo essencial de *B. milleflora* por Simões et al. (2005), porém os componentes encontrados foram: gamagurjunene e alfa-selinene. O composto biciclogermanecreno foi evidenciado por Pereira et al., (2017), como majoritário no óleo essencial de cladódios de *B. milleflora* com porcentagem maior a encontrada neste estudo (12,6 %), considerando que a extração ocorreu a partir de cladódios e não de folhas, as diferenças químicas podem ser justificadas, tendo em vista que fatores como local, clima e partes de extração do produto natural, podem interferir na sua composição química (REHMAN et al., 2016).

Viridiflorol é um composto da classe dos sesquiterpenos oxigenados, espécies do gênero *Baccharis* apresentam grande quantidade de constituintes químicos que estão incluídos nesta classe de compostos e atividades biológicas de plantas desta espécie, incluindo ação antimicrobiana podem ser atribuídas a presença desta classe de componentes químicos (ABAD; BERMEJO, 2007; TROMBIM -SOUZA et al., 2017). O viridiflorol também foi evidenciado como principal componente do óleo essencial de *B. milleflora*, por Trombim-Souza et al., (2017) ao analisarem a quantidade do composto extraído de cladódios e inflorescências de espécime masculina e feminina separadamente, porém foi encontrado diferença entre as espécimes, 33,22 % de viridiflorol em espécime masculina e apenas 2,11 % em feminina, demonstrando grande variação de constituintes químicos provavelmente devido ao estado de desenvolvimento morfológico que está relacionado a síntese de metabólitos secundários (BESTEN et al., 2014).

Espécies do gênero *Bacharis* são utilizadas na medicina tradicional para tratamento de infecções fúngicas, sendo um gênero de alto potencial para desenvolvimento de novos medicamentos. Algumas espécies de *Bacharis* são relatadas na literatura com atividade antimicrobiana, incluindo *B. milleflora*. (RODRIGUES et al., 2016). Os compostos bioativos presentes em produtos naturais podem potencializar a ação de medicações já utilizadas e contribuir para tratamento de acometimentos a saúde humana (MARDARE et al., 2019).

A atividade isolada do óleo essencial contra *C. albicans e C. tropicalis* demostraram baixa atividade antimicrobiana. Resultado semelhante foi descrito por Pereira et al., (2016), que não evidenciou uma Concentração Inibitória Mínima (CIM), clinicamente relevante ao analisar a ação do óleo essencial de *B. milleflora* contra *C. albicans.* Espécies do gênero *Baccharis* são utilizadas na medicina popular para tratamento de infecções fúngicas, e as características químicas dos produtos naturais derivados de espécies deste gênero sugerem possível atividade contra fungos patogênicos (ABAD; BERMEJO, 2007; PEREIRA et al., 2017). Foi evidenciada por Oliveira et al., (2015), atividade antifúngica do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* contra cepas de *C. albicans* e atividade antifúngica da espécie *Baccharis pedunculata* é descrita por Verdi et al. (2005).

Espécies de *Candida* estão entre os principais agentes causadores de infecções, tal fato associa-se a problemática da alta taxa de resistência a antifúngicos. O uso generalizado e mecanismos celulares intrínsecos contribuem para a resistência fúngica, diversos fungos patogênicos desenvolvem mecanismos de resistência ao fluconazol (GEDDES-MCALISTER; SHAPIRO, 2018). A resistência a antimicrobianos inclui mecanismos de células fúngicas, que desenvolvem formas para reduzir a ação de antifúngicos disponíveis, dessa forma o uso de óleos essenciais pode contribuir para descoberta de possíveis moléculas com atividade antifúngica (NAZZARO et al., 2017).

Estratégias terapêuticas, como terapias de associação podem ser uma alternativa para a redução da resistência antimicrobiana, sendo a mistura de compostos químicos advindas de óleos essenciais complexa e diversa, o sinergismo entre eles e os diferentes alvos de ação junto a células patogênicas podem resultar em inibição de crescimento do patógeno (WU et al., 2019; LEE et al., 2020).

Os óleos essenciais possuem uma variedade de alvos junto a micro-organismos patogênicos, e podem alterar a morfologia das células, especialmente com ação sobre a membrana plasmática e o citoplasma (KORNITZ et al., 2019). Foi possível observar neste estudo que o óleo essencial inibiu completamente a emissão de hifas das cepas de *C. albicans* e da cepa padrão de *C. tropicalis*, sendo, portanto, capaz de interferir reduzindo um dos aspectos de virulência fúngica. A resistência a antifúngicos já utilizados associados a manifestação de fatores de virulência, tais como: adesão celular, transição morfológica e formação de biofilmes, contribuem para o aumento da gravidade de infecções, refletindo em elevada taxa de morbidade e mortalidade. A investigação do uso de produtos naturais na inibição de fatores de virulência pode ser uma estratégia promissora (GUEDDES-MCALISTER; SHAPIRO, 2018).

Os resultados evidenciados sugerem que o óleo essencial de *B. milleflora* pode ter ação junto ao processo de transição morfológica fúngica das espécies de *Candida*, considerando que os fungos pertencentes a esta espécie estão entre os principais causadores de infecções fúngicas (HAMMED et al., 2018; ZHANG et al., 2018; SEYOUM et al., 2020), a redução de um de seus fatores de virulência, contribui para o desenvolvimento de terapêuticas inovadoras que possam reduzir os efeitos da invasão por patógenos fúngicos no organismo humano.

A transição morfológica de levedura para hifas aumenta o potencial invasor de fungos e consequentemente sua capacidade de causar infecções no hospedeiro (KORNITZ et al., 2019), dessa forma a inibição de hifas por um produto natural é um mecanismo que pode sugerir importante atividade antimicrobiana frente a estes micro-organismos. De acordo com Kornitz et al., (2019), a transição morfológica de espécies de *Candida albicans* advém de fatores externos e de sinais celulares internos que são capazes de modular a expressão de genes específicos responsáveis por este mecanismo. A transição de filamentos para hifas, requer a expressão de muitos genes e de fatores de transcrição,

ativados por vias de sinalização específicos. Sugere-se assim que a ação do óleo essencial através de mecanismos moleculares não elucidados, pode ter inibido a expressão e fatores de transcrição gênica, com consequente inibição total da emissão de hifas, o que reflete na redução de um dos mecanismos de virulência de espécies de *Candida.*

4 I CONCLUSÃO

A atividade antifúngica do óleo essencial isoladamente apresentou ação clinicamente irrelevante. A associação do produto natural com o fluconazol demonstrou possível sinergismo frente a cepas *de Candida tropicalis.* O óleo essencial de *Baccharis milleflora* inibiu a transição morfológica das cepas fúngicas, demonstrando potencial antimicrobiano, pois foi capaz de inibir um dos fatores de virulência fúngica, podendo essa atividade estar relacionada a ação dos compostos terpenos e a inibição da expressão gênica que induzem formação de hifas. São necessários mais estudos para compreender os mecanismos específicos desta atividade.

REFERÊNCIAS

ABAD, M. J.; BERMEJO, P. *Baccharis* (Compositae): a review update. **Arkivoc**, v. 7, n. 1, p. 76-96, 2007.

ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. **Allured Publishing Corporation**: Carol Stream, 2007.

AGOSTINI, F. et al. Estudo do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Baccharis* (Asteraceae) do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 215-219, 2005.

BESTEN et al. Chemical composition of essential oils from cladodes and inflorescences from male and female specimens of *Baccharis milleflora*. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 17, n. 5, p. 899-905, 2014.

BONI, G. C. et al. Purified bioactive compounds from *Mentha* spp. oils as a source of Candidosis treatment. A brief review. **Revista Fitos**, v. 11 - n 1, 2017.

CARNEIRO, N.P.C. et al. *Piper diospyrifolium* Kunth.: Chemical analysis and antimicrobial (intrinsic and combined) activities. **Microbial Pathogenesis** 136 (2019) 103700, 2019.

COUTINHO, H. D. M. et al. Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. **Chemotherapy,** 54:328–330, 2008.

DEL QUIQUI, E. M. et al. Yield and Chemical Composition of Essential oil of Piperaceae in one Segment of the Semideciduous Forest of Paraná State, Brazil, in Seasonal Samplings. **International Journal of Advanced Engineering Research and Science**, v. 6, n. 5, 2019.

DO AMARAL, W., et al. Essential Oil of *Baccharis milleflora* in the Atlantic Rain Forest of the Paraná State in Brazil: Chemical Composition and Biological Evaluation. In **Natural Bio-active Compounds** (pp. 599-608). Springer, Singapore, 2019.

ESQUINCA, A. R. G.; MORENO, M. C. Papel ecológico de los metabolitos secundarios. **Lacandonia**, v. 2, n. 1, p. 123-130, 2017.

FLORES-VILLA, E. et al. Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): su origen, importancia y generalidades de sus metabolitos secundarios. **TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas**, v. 23, 2020.

Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Manual técnico da vegetação brasileira.** Manuais técnicos em Geociências, número 1, Rio de Janeiro, 92p.1992.

GEDDES-MCALISTER, J.; SHAPIRO, R. S. New pathogens, new tricks: emerging, drug-resistant fungal pathogens and future prospects for antifungal therapeutics. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1435, n. 1, p. 57-78, 2019.

HEIDEN, G. *Baccharis in* **Flora do Brasil 2020 em construção.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB5213>. Acesso em: 09 jan. 2021.

HILLER, C. X. et al. Antibiotic microbial resistance (AMR) removal efficiencies by conventional and advanced wastewater treatment processes: A review. **Science of The Total Environment**, v. 685, p. 596-608, 2019.

JAVADPOUR, M. M. et al. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of Medinal Chemistry**, 39, 107–3113, 1996.

KORNITZER, D. Regulation of *Candida albicans* hyphal morphogenesis by endogenous signals. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 1, p. 21, 2019.

LAWRENCE, G. H. M. **Taxonomia das Plantas Vasculares**, volume I, Fundação Galouste Gulbenkian, Lisboa, 296p. 1951.

LEE, Y. et al. Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond. **Chemical Reviews**, 2020

MARDARE, G. et al. **Secondary Metabolites from Plants: The Thin Border Between Beneficent and Harmful**. 2019.

MORAIS, L. A. S.; CASTANHA, R. F. Composição química do óleo essencial de duas amostras de carqueja (*Baccharis* sp.) coletadas em Paty do Alferes-Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. SPE, p. 628-632, 2011.

MORAIS-BRAGA, M. F. B. et al. *Psidium guajava* L., from ethnobiology to scientific evaluation: Elucidating bioactivity against pathogenic microorganisms. **Journal of Ethnopharmacology**., 194, 1140-1152., 2016.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R.; FEO, V.D. Essential oils and antifungal activity. **Pharmaceuticals**, v. 10, n. 4, p. 86, 2017.

NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

OLIVEIRA, C. F. et al. Evaluation of antifungal activity of essential oil of *Baccharis dracunculifolia* DC. against the yeast of the species *Candida albicans*. **Visão Acadêmica**, v. 16, n. 4, 2016.

PEREIRA, C. B. et al. Chemical composition and Biological activities of *Baccharis milleflora* essential oil.**Latin American Journal of Pharmacy**. 35 (10) 2225 – 33, 2016.

PEREIRA, C. B. et al. Cytotoxic mechanism of *Baccharis milleflora* (Less.) DC. essential oil. **Toxicology in Vitro**, v. 42, p. 214-221, 2017.

REHMAN, R. et al. Biosynthesis of essential oils in aromatic plants: A review. **Food Reviews International**, v. 32, n. 2, p. 117-160, 2016.

SEYOUM, E.; BITEW, A.; MIHRET, A. Distribution of *Candida albicans* and non-albicans *Candida* species isolated in different clinical samples and their in vitro antifungal suscetibity profile in Ethiopia. **BMC Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 1-9, 2020.

SHAHABUDIN, S.; AZMI, N. S. *Candida*, the Opportunistic Human Pathogen. In: **Materials Science Forum**. Trans Tech Publications Ltd, 2020.

SANTOS, C. H.; PICCOLI, R. H.; TEBALDI, V. M. R. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e compostos isolados frente aos agentes patogênicos de origem clínica e alimentar. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 76, p. e1719, 2017.

SILVA, M. O.; AQUINO, S. Resistência aos antimicrobianos: uma revisão dos desafios na busca por novas alternativas de tratamento. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, p. 472-482, 2018.

SILVA, L. N. et al. Current Challenges and Updates on the Therapy of Fungal Infections. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 7, p. 495-499, 2019.

SIMÕES, C. A. et al. Investigation of the essential oil from eight species of *Baccharis* belonging to sect. Caulopterae (Asteraceae, Astereae): a taxonomic approach. **Plant Systematics and Evolution**, v. 253, n. 1, p. 23-32, 2005.

SWAMY, M. K.; AKHTAR, M. S.; SINNIAH, U. R. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.

TROMBIN-SOUZA, M. et al. Chemical composition of the essential oils of *Baccharis* species from southern Brazil: a comparative study using multivariate statistical analysis. **Journal of Essential Oil Research**, v. 29, n. 5, p. 400-406, 2017.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

WANI, A. R. et al. An updated and comprehensive review of the antiviral potential of essential oils and their chemical constituents with special focus on their mechanism of action against various influenza and coronaviruses. **Microbial Pathogenesis**, p. 104620, 2020.

WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de clevenger para extração de óleos essenciais. **Revista Faculdade de Farmácia e Bioquímica**, São Paulo, v.1, n. 1, p. 77-81, 1963.

WU, S-C et al. Natural Products That Target Virulence Factors in Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 48, p. 13195-13211, 2019.

ZHANG, W et al. Epidemiology, risk factors and outcomes of *Candida albicans* vs. non-a*lbicans* candidaemia in adult patients in Northeast China. **Epidemiology & Infection**, v. 147, 2019.

CAPÍTULO 7

CONTAMINAÇÃO NO CULTIVO CELULAR: BOAS PRÁTICAS NO LABORATÓRIO

Data de aceite: 26/05/2021
Data de submissão: 15/03/2021

Giulia Galani Martha
Universidade Federal de Santa Catarina
Florianópolis, Santa Catarina
http://lattes.cnpq.br/2088999381986220

Susane Lopes
Universidade Federal de Santa Catarina
Florianópolis, Santa Catarina
http://lattes.cnpq.br/0622601144873237

Marcelo Maraschin
Departamento de Fitotecnia
Florianópolis, Santa Catarina
http://lattes.cnpq.br/9590623317873900

RESUMO: A contaminação celular é um problema sério, que pode ser recorrente nos laboratórios, com fontes de contaminantes variadas. Sendo assim, é importante garantir a implementação de protocolos básicos de detecção, prevenção e tratamento do contaminante afim de evitar diversos problemas, i.e., recursos financeiros, tempo de trabalho e alterações morfológicas e bioquímicas das células, conduzindo à resultados equivocados. Posto isto, o presente trabalho teve como objetivo a revisão literária de artigos abordando a prevenção, detecção e tratamento de contaminantes de culturas de células.

PALAVRAS-CHAVE: Contaminação celular, detecção, prevenção, tratamento.

CONTAMINATION IN CELL CULTURE: GOOD PRACTICES IN THE LABORATORY

ABSTRACT: Cellular contamination is a serious problem, which can be recurrent in laboratories, with varied sources of contaminants. Therefore, it is important to ensure the implementation of basic protocols for the detection, prevention and elimination of the contaminant in order to avoid several problems, i.e., from financial resources, working time to the morphological and biochemical alterations of the cells, leading to erroneous results. That said, the present work aimed at the literary review of articles addressing the prevention, detection and treatment of contaminants in cell culture.

KEYWORDS: Contamination cell, detection, prevention, treatment.

1 I INTRODUÇÃO

Desde o surgimento da cultura celular como aliada de diversas pesquisas, o principal e maior problema encontrado por todos os pesquisadores é a contaminação celular. A contaminação pode atingir a cultura celular como uma substância química, física ou biológica (LINCOLN; G.GABRIDGE, 1998) e estender-se por um longo período sem apresentar danos aparentes à célula (DREXLER; UPHOFF, 2002).

Para evitar qualquer tipo de contaminação, protocolos básicos de limpeza e biossegurança devem ser adotados. Algumas das maiores contribuições para protocolos são

as técnicas de assepsia, conhecimento da sua cultura celular - para identificar facilmente qualquer mudança comportamental - e cuidados com materiais utilizados (STACEY, 2011).

Além destes protocolos básicos, a criação de legislações e o cumprimento de portarias tornam-se extremamente necessários para garantir com eficiência a biossegurança, auxiliando na conscientização do profissional e assim, prevenindo, minimizando e eliminando riscos para a sua saúde e meio ambiente (ZOCHIO, 2009).

Entretanto, mesmo com a adoção de protocolos para evitar o desenvolvimento das contaminações, ocasionalmente, elas podem ocorrer e causar problemas que podem ser divididos em três classes: pequenos aborrecimentos, onde algumas placas de cultivo são perdidas; problemas sérios, quando experimentos ou culturas inteiras são perdidos; e grandes catástrofes, que invalidam um trabalho inteiro (RYAN, 1994). Além disso, em casos mais graves, pode resultar em mudanças nas características celulares, como crescimento e morfologia (BATES; WERNERSPACH, 2011). Com isso, torna-se necessário a identificação do mesmo, além de tratamentos celulares e no ambiente para garantir a eliminação do agente contaminante.

Assim, o objetivo do presente trabalho é considerar os diversos tipos de contaminações em culturas celulares, bem como a forma como agem, suas principais consequências e como tratá-las. Adicionalmente, são elencados protocolos básicos e portaria como ferramentas à minimizar contaminações em laboratórios de cultivo celular.

2 I METODOLOGIA

O presente trabalho constitui-se em uma revisão de literatura com abordagem qualitativa. Realizou-se a pesquisa bibliográfica através de artigos científicos publicados desde 1973 até os dias atuais, encontrados nos portais eletrônicos da SCIELO e Periódico CAPES. Para a pesquisa, foram utilizados as seguintes palavras-chave: *contamination of cell culture, asepsis, biosafety, sterelization methods, cell culture protocol.*

Dos artigos encontrados foram selecionados aqueles que citam pesquisas com diversos tipos de contaminantes de cultura celular ou biossegurança para combater e prevenir as contaminações. Neles, os autores empregaram métodos de investigação *in vitro* de diversos tipos celulares para analisar a incidência de contaminação.

3 I CONTAMINAÇÃO

A contaminação celular é um dos problemas mais comuns em laboratórios de cultivo *in vitro* e pode ser definida como um elemento indesejável na cultura celular, tendo como um dos principais problemas seu potencial efeito adverso no sistema celular. A contaminação pode ser dividida de duas maneiras: contaminação biológica e contaminação química (CHEPRASOV, 2018).

Vários problemas podem ser identificados quando ocorre contaminação celular,

incluindo experimento e tempo perdidos. Além disso, em casos mais graves, pode resultar na mudança das características celulares, como crescimento e morfologia (RYAN, 1994).

3.1 Detecção

3.1.1 Tipos de contaminação

3.1.1.1. Contaminação biológica

Contaminações biológicas podem ser divididas em dois grupos baseando-se na dificuldade de detecção: fácil detecção (bactérias, fungos e leveduras) e difícil detecção (vírus, protozoários, insetos e micoplasmas) (RYAN, 1994).

a) Fácil detecção

As **bactérias** são microrganismos unicelulares com micrômetros de diâmetro e diversas variações morfológicas entre si. Por ser onipresente e possuir rápida taxa de crescimento, são os contaminantes mais comuns encontrados e demoram apenas alguns dias para serem detectados por inspeção visual (RYAN, 1994; THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2020). As culturas infectadas por bactérias ficam turvas e possuem queda repentina do pH do meio de cultura, além de resultar em morte celular (BATES; WERNERSPACH, 2011).

A figura 1 mostra células da linhagem 293 (rim embrionário humano) aderentes e contaminadas com *E. coli.* Os espaços entre as células mostram pequenos grânulos cintilantes sob microscopia de fase, mas as bactérias individuais não são facilmente distinguíveis (painel A). Uma ampliação adicional da área delimitada pelo quadrado preto mostra as células individuais de *E. coli* (B), que geralmente têm formato de bastonete e medem cerca de 2μm de comprimento e 0,5μm de diâmetro. Cada lado do quadrado preto no painel A é equiavlente a 100μm.

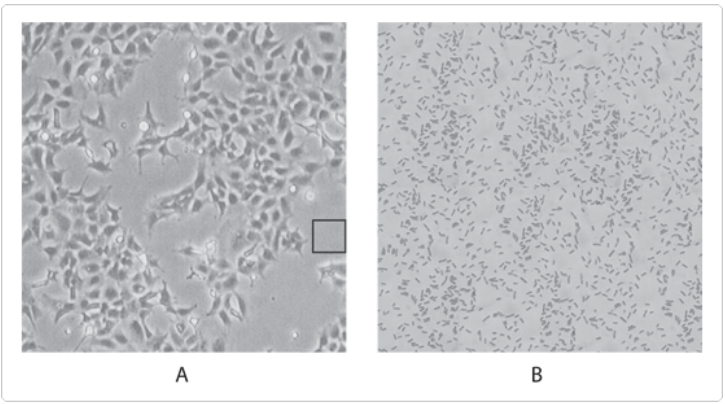


Figura 1: **Contaminação por bactéria.** Imagem de contraste de fase simulada em células da linhagem 293 (rim embrionário humano) contaminadas por bactéria *E. coli* (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2020).

As **leveduras** são organismos unicelulares classificados no reino Fungi. Comparando com a contaminação por bactérias, a contaminação por leveduras torna a cultura celular turva conforme a mesma se espalha pelo meio de cultura. O pH do meio é estável inicialmente, porém ao contaminar mais rapidamente, o mesmo começa a se elevar (PEREIRA, J., MATTOS, M., FORTES, G., 2003). No microscópio é possível visualizar partículas ovais ou espirais (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2020), como demonstrado na figura 2:

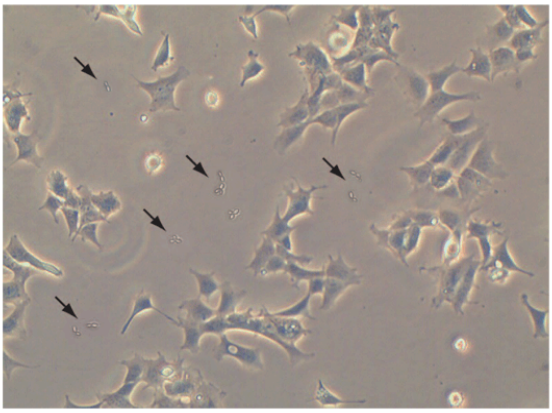


Figura 2: **Contaminação por leveduras.** Imagem de contraste de fase simulada em células da linhagem 293 (rim embrionário humano) cultura aderente contaminada com levedura. As células de leveduras contaminantes aparecem como partículas ovais, germinando partículas menores à medida que se replicam (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2020).

Os **fungos** são microrganismos eucarióticos que crescem em hifas (filamentos multicelulares). Com uma contaminação parecida com as leveduras, o pH do meio de cultura continua o mesmo inicialmente e depois há uma elevação rápida do mesmo. Na microscopia, é possível observar os micélios do fungo como filamentos finos ou os esporos aglomerados (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2020). A figura 3 mostra dois tipos de fungos que podem ser encontrados em cultivos celulares.

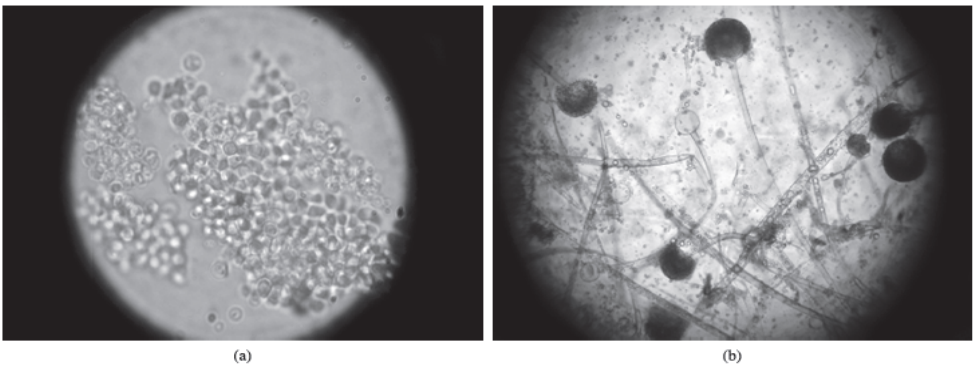


Figura 3: **Contaminação por fungos.** Imagem de contraste de fase do fungo *Rhodotorula* sp. (a) e *Mucor* sp. (b). Material coletado de PVC em aterros sanitários (GRISA, Ana M. C. et al., 2011).

b) Difícil detecção

Os **vírus** são agentes infecciosos que se utilizam das células hospedeiras para sua propagação. Por possuir um tamanho extremamente reduzido, sua detecção em cultura torna-se difícil de identificar e remover (FOGH, 1971). O uso de culturas celulares contaminadas com vírus podem significar riscos à saúde das pessoas do laboratório. A contaminação pode ser detectada por microscopia eletrônica, imunocoloração com anticorpos, ou ensaios ELISA ou PCR (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2020). Apesar de ser uma contaminação de difícil controle, os vírus possuem rigorosos requisitos para o mecanismo celular de sua célula hospedeira, o que limita sua capacidade de infectar culturas celulares de outras espécies (RYAN, 1994).

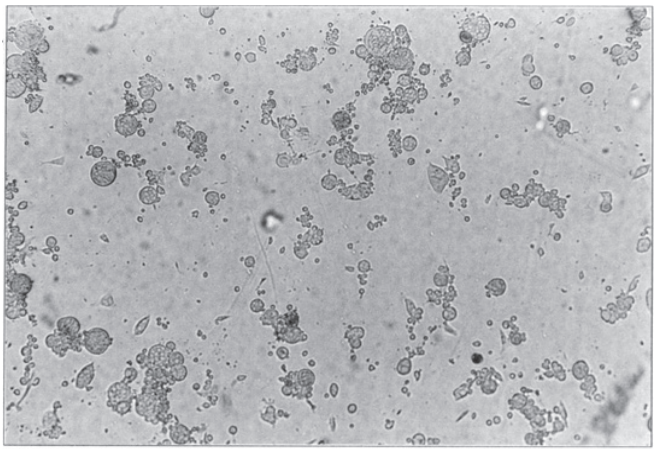


Figura 4: **Contaminação por vírus.** Imagem do efeito citopático causado pelo VHS tipo 2 em linhagem contínua de rim de coelho (CRUZ, et al., 1992).

Os **protozoários** de vida livre ou parasitas podem ser identificados como contaminantes de cultura celular. Podem formas esporos que contaminam pessoas ou equipamentos no laboratório, chegando até a cultura, resultando num efeito citopático parecido com os vírus, podendo ocasionar destruição total da cultura celular em poucos dias. Por apresentarem crescimento lento e morfologia parecida com células de cultura, torna-se difícil sua detecção se não houverem suspeitas prévias (RYAN, 1994).

Insetos e aranhas são frequentemente encontrados em áreas do laboratório, podendo causar contaminações principalmente em salas quentes, ou ainda serem importantes fontes de contaminação microbiana (RYAN, 1994).

O **micoplasma** são bactérias que não possuem parede celular e são consideradas o menor organismo auto-replicante. Mesmo em condições ideais, eles crescem muito lentamente. O tempo entre uma geração e outra pode variar de 1 até 9 h e, até formar uma colônia visível, pode demorar uma semana (DREXLER; UPHOFF, 2002). Por conta do seu tamanho reduzindo, menor que um micrômetro, sua detecção é extremamente difícil até causar grande deterioração da cultura celular. Alguns micoplasmas podem causar alteração na morfologia celular sem induzi-la a apoptose (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2020). Apenas testes específicos podem confirmar a presença deste contaminante na cultura celular, como, i.e., cultivo direto, a utilização de precursores radioativos pelas células infectadas, os testes enzimáticos, a coloração com anticorpos fluorescentes ou com corantes citoquímicos fluorescentes (MIYAKI, 1989).

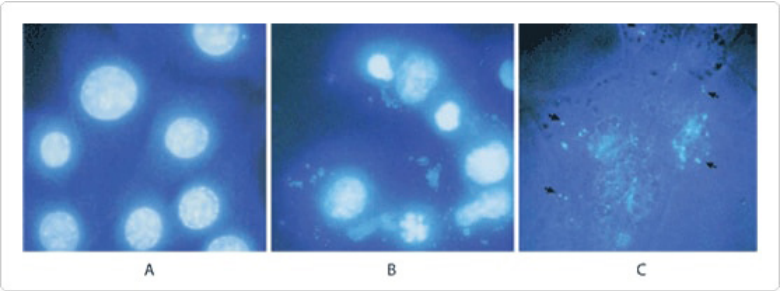


Figura 3: **Contamminação por micoplasma.** A). As culturas foram testadas usando o Kit de Detecção de Mycoplasma MycoFluor™, seguindo os protocolos do kit. Em células fixas, o reagente MycoFluor™ tem acesso aos núcleos celulares, que são intensamente corados com reagente, mas a ausência de objetos extranucleares fluorescentes indica que a cultura está livre de contaminação por micoplasma (painel A). Em células fixas infectadas com micoplasma, o reagente MycoFluor™ mancha os núcleos e o micoplasma, mas a intensa fluorescência relativa dos núcleos obscurece o micoplasma nos núcleos ou próximo a eles. No entanto, o micoplasma separado dos núcleos brilhantes é facilmente visível (painel B). Nas células vivas, o reagente MycoFluor™ não tem acesso aos núcleos, mas mancha rapidamente o micoplasma associado ao exterior das células (painel C). As imagens foram obtidas usando excitação de 365nm e uma lente objetiva 100/ 1,3 Plan Neoflaur® (Zeiss) acoplada a um filtro passa-banda de 450 ± 30nm (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2020).

3.1.1.2. Contaminação química

A contaminação química trata-se de qualquer substância não-viva que possui efeitos indesejáveis na cultura celular. Qualquer reagente, mesmo os utilizados em experimentos, podem ser contaminantes, dependendo da quantidade encontrada no meio. As principais fontes de contaminação química são: meio de cultura, água, endotoxinas, alguns tipos de soro, radicais livres, metais pesados, recipientes e tubos de armazenamento de plástico, e resquícios de produtos de limpeza (CHEPRASOV, 2018).

Ao longo dos experimentos, a **água** é utilizada de diversas maneiras: durante a produção de meio de cultura, para limpar os recipientes, entre outros. Porém, muitas vezes ela é a fonte de contaminação química. Apesar dos laboratórios purificarem a água através de destiladores, osmose reversa, troca iônica e ultrafiltração, é necessário garantir que estes sistemas mantenham-se em perfeitas condições, garantindo a qualidade da água. Entretanto, águas altamente purificadas podem ocasionar na lixiviação de íons metálicos tóxicos de vidros ou recipientes de plástico, resultando em contaminação do meio de cultura (RYAN, 1994).

As **endotoxinas** são frequentemente encontradas na água e outros aditivos do meio de cultura. Estudos apontam que este contaminante pode afetar o crescimento e desempenho celular, ocasionando em um alto desvio em experimentos (RYAN, 1994). Anteriormente, soros eram uma importante fonte deste contaminante. Após diversos estudos, os fabricantes conseguiram reduzir sua presença no produto manuseando os produtos sob condições assépticas. Sistemas de água mantidos de maneira inadequada apresentam níveis significativos de bactérias produtoras de endotoxinas (CORNING LIFE SCIENCES, 2017).

Os **soros** são um contaminante de grande potencial, tanto biológico, quanto químico. Por serem coletados de animais individuais e com controle de qualidade diferente entre cada fornecedor, existe uma variação incontrolável de hormônios, enzimas e ácidos graxos neste produto. Por conta deste fatores, há uma grande chance dele vir com variações que intervirão no resultado final do experimento (LINCOLN; G.GABRIDGE, 1998).

Grande parte das contaminações ocorrem através do **meio de cultura**, que provém da matéria-prima utilizada para fazê-lo e de reagentes, aditivos e suplementos (LINCOLN; G.GABRIDGE, 1998). Todos os produtos utilizado na cultura de células devem passar por um controle de qualidade com os seguintes indicadores: teste de esterilidade, avaliação do pH, características físicas (ausência de bolhas, artefatos, água de condensação, turbidez, precipitados, espessura, consistência e coloração do meio) e teste de viabilidade ou inibição do crescimento microbiano (MANRIQUE; PAIVA; LIMA, 2016).

Além disso, os **radicais livres** são gerados no meio de cultura pela fotoativação de triptofano, riboflavina ou HEPES (agente tamponador de ácido sulfônico zwitteriônico) expostos à luz fluorescente. Esses componentes produzem peróxido de hidrogênio e

radicais livres que são tóxicos para as células. A contaminação com radicais livres torna-se perigosa quando a exposição é constante e não apenas para a manutenção da cultura celular, ou seja, quando a mesma é guardada em locais de constante iluminação (RYAN, 1994).

Adicionalmente, **meios armazenados** em garrafas de vidro ou plástico que contenham metais pesados ou compostos orgânicos tornaram-se outra fonte de contaminação. Outro problema em meios de armazenamento é a lavagem inadequada de recipientes, deixando resíduos de produtos químicos utilizados para a desinfecção. Os contaminantes podem ser absorvidos pela célula ou meio de cultura durante o contato (CORNING LIFE SCIENCES, 2017). Fatores como dimensão física e *design* do material também podem influenciar na contaminação, podendo resultar em uma troca de gás e/ou umidade, alterando o pH, saturação e esterilidade da cultura celular (LINCOLN; G.GABRIDGE, 1998).

Apesar de ser considerada uma fonte de contaminação biológica, a **estufa incubadora** também é responsável por diversas contaminações químicas. As misturas gasosas que geralmente possuem dióxido de carbono para ajudar na regulação do pH do meio podem conter impurezas tóxicas, principalmente óleos ou outros tipos de gases resultante da reutilização do cilindro de armazenamento. Além disso, a limpeza inadequada da incubadora pode resultar em resquícios de produtos que contaminarão o meio de cultura, interferindo na manutenção adequada da cultura celular (RYAN, 1994).

3.2 Prevenção

Algumas recomendações são feitas para reduzir a probabilidade de contaminação na cultura celular. A falta de procedimentos básicos como limpeza padrão e outros métodos de esterilização resultam em grandes problemas a longo prazo. Para a prevenção, é necessário adotar alguns protocolos que ajudarão a reduzir os contaminantes (RYAN, 1994), tais como:

- Lavar as mãos antes de colocar as luvas;
- O uso de luva e sua troca frequente;
- Fazer a assepsia dos materiais com álcool 70%, bem como das mãos (antes e após colocar as luvas) sempre que necessário;
- Utilize pró-pés;
- Use um jaleco limpo e exclusivo para a área da cultura;
- Usar frascos na cultura celular com tampa ventilada, pois a presença da membrana filtrante permitirá trocas gasosas estéreis;
- Evitar vestígios de meio no pescoço dos frascos utilizados, que acarretará em um meio de entrada para os microrganismos. Caso ocorra o vazamento, limpar com gaze e álcool;

- Quando houver transporte das placas de cultura, fazê-la em caixas ou bandejas para minimizar o contato com contaminantes do ar;
- Não utilizar a cabine de fluxo laminar para armazenamento;
- Não faça a pipetagem com a boca, pois além do grande risco biológico para a pessoa, resulta no contato direto com uma fonte de microrganismos;
- Trabalhe com apenas uma linhagem celular por vez na cabine de fluxo laminar e use garrafas de meio e outros reagentes separado, evitando uma possível contaminação cruzada;
- Limpe frequentemente o banho de água utilizado para aquecer meio e outras soluções. Além disso, é necessário secar o frasco aquecido antes de colocá-lo cabine de fluxo laminar e borrifar álcool 70% para desinfecção;
- Use pipetas com filtro;
- Fracione soluções estéreis, como tripsina e antibióticos, o que reduzirá a probabilidade de contaminação cada vez que utilizar o frasco;
- Deixe a luz UV ligada por pelo menos 15 minutos antes de cada trabalho e, se possível, deixe o exaustor da cabine do fluxo ligado durante a semana de trabalho;
- Limpe a superfície de trabalho com álcool 70% antes e depois de cada uso e, caso utilize mais de uma linhagem celular, limpar entre elas;
- Não use queimadores Bunsen dentro de exaustores de fluxo laminar. Além de desnecessário, poderá causar danificação do filtro HEPA;
- Mantenha a porta fechada durante o trabalho;
- Minimize o tráfego de pessoas durante o trabalho;
- Reduza a quantidade de partículas e aerossóis no laboratório;
- Limpe periodicamente a estufa incubadora;
- Descarte os resíduos com segurança. Recomenda-se autoclavar qualquer resíduo que tenha entrado em contato com células;
- Limpe serpentinas de refrigeradores. Elas são uma das principais fontes de contaminantes no ar;
- Tenha em seu laboratório um programa de manejo de pragas, como ratos e baratas (CORNING LIFE SCIENCES, 2017);
- O meio de cultura deve ser preparado com produtos químicos puros e com classificação P.A (para análise), se disponível (STREET, 1973);

- Uma ante sala mostra-se extremamente eficaz para evitar a entrada de microrganismos contaminantes na sala de cultura. Ela servirá para os pesquisadores fazerem sua higienização e a dos produtos antes da entrada na sala principal, criando uma barreira para os contaminantes.

Além disso, métodos de esterilização e assepsia deverão ser implementados, assim como uma limpeza padrão do laboratório.

3.2.1 Esterilização

A esterilização é a eliminação total de qualquer tipo de organismos vivos, patogênico ou não, em um objeto inanimado. Ela poderá ser feita a partir de métodos físicos, como calor e radiação, ou químicos, sendo líquido ou gasoso (UFRGS, 2020).

A sensibilidade dos organismos ao **calor** pode variar de acordo com alguns fatores, como pH, composição e quantidade de água do meio, capacidade de formação de esporos e variação individual de resistência (MORIYA, T; MÓDENA, JLP; 2008).

As **estufas ou fornos** possuem o menor poder de penetração, sendo necessário utilizar tempos e temperaturas maiores. Utiliza-se temperaturas constantes de 160 a 180 ºC durante 30 a 120 min (UFRGS, 2020; ESCOLA DE QUÍMICA, s.d. Adicionalmente, são usadas principalmente para esterilizar materiais secos, como vidrarias (MORIYA, T; MÓDENA, JLP; 2008).

Já na esterilização feita com o **calor úmido**, a utilização de uma temperatura elevada com a umidade resulta em uma maior efetividade para destruir microrganismos, ocorrendo a desnaturação de proteínas e a alteração de carboidratos. Pode ser feita a partir da autoclave e ebulição (fervura a 100 °C durante 15 min) (ESCOLA DE QUÍMICA, s.d.).

A **autoclave** utiliza o calor na forma de vapor da água sob pressão (ESCOLA DE QUÍMICA, s.d.). Ocorre a difusão da água dentro da membrana celular, hidratando o protoplasma e coagulando-o sob a ação do calor. É um método efetivo e causa poucos danos ao instrumento. Geralmente utilizado para esterilização de meios de cultura ou vidrarias e ponteiras. Acontece em uma temperatura média de 121 ºC durante 15 min (UFRGS, 2020).

No caso de esterilização com agentes químicos, estabeleceu-se os seguintes princípios ativos para desinfetantes através da Portaria 15/88 do Ministério da Saúde:

- Aldeídos/Glutaraldeído: possui atividade bactericida, viruscida, fungicida e esporicida. Este desinfetante é indicado em casos de alto nível em instrumentos termossensíveis e pode ser utilizado como esterilizante. É tóxico e deverá ser usado com EPI (equipamento de proteção individual);

- Quaternário de Amônio: indicado apenas para desinfecção de superfícies;

- Compostos orgânicos liberadores de cloro ativo: produzidos em forma de pó, possui maior atividade microbiana, pH mais baixo, maior estabilidade e ação

corrosiva e tóxica mais baixas se comparados ao hipoclorito;

- Compostos inorgânicos liberadores de cloro ativo:
- Hipoclorito de sódio/lítio/cálcio: instável, termossensível, fotossensível e sofre inativação rapidamente quando em contato com compostos orgânicos. Não pode ser utilizado em materiais metálicos por ser altamente corrosivo;
- Álcool: desnaturam a proteína do microrganismo. É bactericida, viruscida, fungicida e tuberculicida, não possuindo potencial de destruição esporicida (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

3.3 Tratamento

Existem quatro principais tipos de tratamento para contaminações celulares: tratamento físico, químico, imunológico e quimioterapêutico. A erradicação total da contaminação geralmente leva tempo e pode ser mal sucedida, além de resultar em infecções secundárias para outras culturas celulares. Recomenda-se utilizar métodos baratos, fáceis, eficientes e confiáveis para que não haja perda das características individuais. No entanto, ainda não existe um método ideal e totalmente eficaz (DREXLER; UPHOFF, 2002).

Tratamentos físicos e químicos envolvem principalmente a esterilização do ambiente e de equipamentos por diversos métodos, afim de eliminar novas fontes de contágio, conforme supracitado como formas de prevenção (DREXLER, UPHOFF, 2002). Para a desinfecção das mãos são utilizadas soluções antissépticas com detergentes para a degermação da pele (remoção das impurezas). Para a assepsia total das mãos, a limpeza é finalizada com álcool iodado ou etílico (MORIYA, T; MÓDENA, JLP; 2008). É necessário a limpeza correta nas duas etapas (com detergentes e álcool), já que na pele são encontrados dois tipos de bactérias: transitórias (removidas mecanicamente na degermação) e residentes (população estável que é removida pelas soluções antissépticas) (UFRGS, 2020).

Os equipamentos de proteção individual (EPI) servem para proteger do contato com agentes infecciosos ou substâncias tóxicas, além de prevenir contaminantes em experimentos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999). Qualquer manipulação com amostras biológicas ou químicas podem resultar na entrada de partículas através das vias aéreas, causando problemas de saúde. O uso do EPI é obrigatório e seu uso indevido pode provocar acidentes (ZOCHIO, L., 2009). Os equipamentos de proteção individual considerados essenciais são: jalecos, luvas, máscaras, óculos e protetores faciais. É importante lembrar que os EPIs deverão ser retirados ao sair do laboratório, evitando a disseminação de agentes biológicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999). O nível de segurança II é adequado para qualquer trabalho com sangue humano, líquidos corporais, tecidos ou linhas celulares em geral (SPLABOR, 2020). Já os equipamentos de proteção coletiva/cabines de segurança biológica (EPCs ou CSB) serão utilizados para proteger o profissional e o ambiente laboratorial (ZOCHIO, L., 2009). A cabine de segurança biológica proporciona a

contenção de borrifos ou aerossóis infecciosos. Ela pode ser classificada de acordo com sua segurança biológica (classes I, II e III) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Para a descontaminação total do laboratório é importante garantir a esterilização de todos os equipamentos, utilizando EPIs e EPCs para evitar novos contágios (ZOCHIO, L, 2009). O cuidado e a assepsia correta de todos os equipamentos com álcool 70% e cloro, o descongelamento de novas células, a verificação da qualidade de todo e qualquer material usado são cruciais para garantir a eliminação total do contaminante. Além disso, a adoção de novos protocolos podem ajudar na erradicação e prevenção, como a utilização de pro-pés, manutenção e limpeza frequente dos equipamentos, controle do meio utilizado, garantindo um meio sempre novo e sem fontes de contaminação. A metodologia de fumigação do ambiente também é recorrentemente utilizada, principalmente quando a origem da contaminação presente é desconhecida. A técnica em questão consiste no uso de compostos químicos voláteis no local, como o formaldeído, por um período suficiente para volatização do volume total (BQA, 2019).

Outros tratamentos são utilizados conforme a identificação do contaminante. Para o controle de micoplasmas, as culturas frequentemente são tratadas com antibiótico BM-Cyclin (tiamulin-hydrogenfumarat and Minocyclinhydrochloride) (SIGMA, 2020), que possui *tiamulin* e *minocycline*, dois antibióticos que previnem a síntese proteica (LOPES et al., 2020). Porém, apesar de antibiótico ser um tratamento extremamente utilizado para o combate aos micoplasmas e outros tipos de contaminações, este tratamento não elimina todos os organismos, alguns apenas suprimem ou diminuem seu metabolismo até acabar com mudanças grotescas na cultura celular, mas não interrompendo mudanças bioquímicas e antigênicas (FOGH, 1973).

Para a descontaminação de culturas celulares com fungos ou bactérias, é recorrentemente utilizado antimicrobianos. Caso a contaminação fúngica mostre-se grave, recomenda-se o uso de anfotericina B junto ou separadamente da nistatina. Quando se trata de uma contaminação bacteriana grave, existe uma grande variedade de antimicrobianos, sendo necessário a identificação do Gram bacteriano para a escolha. Para Grams negativos por exemplo, a amicacina, estreptomicina, gentamicina e tetraciclina são recomendados. Já para Gram positivo, o uso de penicilina, clindamicina e eritromicina são frequentes (HARRISON, RAE, 1997; LAMBERT, 1998).

4 I CONCLUSÃO

A contaminação celular é um problema sério e recorrente em laboratórios. A identificação e detecção da fonte contaminante em um cultivo celular são cruciais para o tratamento rápido e preciso. Além disso, a implementação de protocolos básicos é necessária e fundamental para prevenir e/ou minimizar os riscos de contaminações e, caso esta condição de se estabeleça, possam ser tomadas providências instantâneas e

articuladas afim de evitar situações críticas que afetem as características metabólicas da cultura celular que resultam, comumente, no banimento de toda a linhagem contaminada.

REFERÊNCIAS

BATES, Mary Kay; WERNERSPACH, Douglas. **Cell Culture Contamination: understanding the causes and managing the risks: Understanding the Causes and Managing the Risks. Lab Manager**, v. 6, n. 4, p. 1-4, maio 2011.

BQA, CCB **Regulamento e Normas Gerais de Uso da Sala de Cultura da Neuroquímica**, 2019. Disponível em < http://saladeculturabqa.paginas.ufsc.br/files/2019/09/REGULAMENTO-E-Normas-Gerais-de-Uso-da-Sala-de-Cultura-213C-atualizada-em-09-09-2019.docx>. Acesso em 13 de Agosto de 2020.

CHEPRASOV, Artem. **Cell Culture Contamination: Types & Identification**. 2018. Disponível em: https://study.com/academy/lesson/cell-culture-contamination-types-identification.html. Acesso em: 22 maio 2020.

CORNING LIFE SCIENCES. **A Guide to Understanding and Managing Cell Culture Contamination**. Tewksbury: Corning Incorporated, 2017. Disponível em: https://www.chemie-brunschwig.ch/documents/suppliers-information/CLS-AN-020-cell-culture-contamination-guide-A4.pdf. Acesso em: 22 maio 2020.

DREXLER, Hans G.; UPHOFF, Cord C. **Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention**. **Cytotechnology**, Netherlands, v. 39, n. 2, p. 75-90, ago. 2002. Springer Science and Business Media LLC.

ESCOLA DE QUÍMICA. **Desinfecção e Esterilização**. Rio de Janeiro: Ufrj, s.d.

FOGH, J., Nelda B. Holmgren, & Ludovici, P. (1971). **A Review of Cell Culture Contaminations.** ***In Vitro****, 7*(1), 26-41. Retrieved May 22, 2020, from www.jstor.org/stable/4291579

HARRISON, M., RAE., **General techniques of cell culture.** Handbooks in Practical Animal Cell Biology. Cambridge: Cambridge University Press, 1997.

LINCOLN, Carolyn Kay; G.GABRIDGE, Michael. **Methods in Cell Biology: cell culture contamination: sources, consequences, prevention, and elimination.** New York: Academic Press, 1998.

LOPES, B. R. P. et al. **Diagnosis and treatment of HEp-2 cells contaminated with mycoplasma.** Braz. J. Biol., São Carlos, 2020. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842020005009201&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 15 junho 2020. Epub Abril 22, 2020.

MANRIQUE, Edna J. C.; PAIVA, Eduardo S. de; LIMA, Ana Beatriz M.. **O controle de qualidade dos meios de cultura como ferramenta para assegurar a confiabilidade dos ensaios microbiológicos.** In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 52, 2016, Maceió. **Anais do 52º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** Goiânia: Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros, 2016.

Ministério da Saúde. **Orientações Gerais para Central de Esterilização**. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

MIYAKI, Cosue et al. **Micoplasma como contaminante de culturas celulares mantidas em laboratórios de instituições particulares e oficiais.** Rev. Saúde Pública, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 39-44, Feb. 1989 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89101989000100006&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 21 Maio 2020.

Moriya T, Módena JLP. **Assepsia e antissepsia: técnicas de esterilização.** Medicina (Ribeirão Preto). 2008; 41 (3): 265-73.

PEREIRA, Jonny Everson Scherwinski; MATTOS, Maria Laura Turino; FORTES, Gerson Renan de Luces**. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados.** Pesq. agropec. bras., Brasília , v. 38, n. 7, p. 827-834, July 2003 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2003000700006&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 2 Augusto 2020.

RYAN, John. **Understanding and Managing Cell Culture Contamination**. Lowell: Life Sciences, 1994. Disponível em: https://nexusacademicpublishers.com/uploads/portals/Cell_culture_contaminations_.pdf. Acesso em: 21 maio 2020.

SIGMA. **BM-Cyclin.** Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/10799050001?lang=pt®ion=BR. Acesso em: 15 de junho de 2020.

STACEY, G. N. **Cell Culture Contamination. In: Cree I. (eds) Cancer Cell Culture. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)**. Human Press, 2011.

STREET, Herbert Edward. **Plant Tissue and Cell Culture**. California: Blackwell Scientific Publication, 1973.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Cell Culture Contamination**. Disponível em: https://www.thermofisher.com/br/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/biological-contamination.html. Acesso em: 21 maio 2020.

UFRGS. **Assepsia Cirúrgica**. Disponível em: http://www.ufrgs.br/blocodeensinofavet/ensino/tecnica-cirurgica/assepsia-cirurgica. Acesso em: 24 maio 2020.

ZOCHIO, Larissa Barbosa. **Biossegurança em Laboratórios de Análises Clínicas**. São José do Rio Preto: Academia de Ciência e Tecnologia

CAPÍTULO 8

LA VACUNA RECOMBINANTE EG95 EN HOSPEDEROS INTERMEDIARIOS

EL LARGO CAMINO RECORRIDO EN LA BÚSQUEDA DE UNA VACUNA, PARA PREVENIR HIDATIDOSIS. DESDE LA INVESTIGACIÓN HASTA SU APLICACIÓN EN PROGRAMAS DE CONTROL. (1927 - 2016)

Data de aceite: 26/05/2021

Jensen Oscar
Centro de Investigación en Zoonosis. Ministerio de Salud y Ministerio de la Producción
Sarmiento, Chubut, Argentina

Gertiser María Laura
Centro de Investigación en Zoonosis. Ministerio de Salud y Ministerio de la Producción
Sarmiento, Chubut, Argentina

RESUMEN: La echinococcosis quística (EQ) es una zoonosis **controlable**. El ciclo del parásito se conoce desde el año 1853 y fue durante el año 1864 que se inician en algunas regiones del mundo campañas de educación sanitaria y control de faena con el fin de intentar prevenir la enfermedad. En el año 1890 se iniciaron las desparasitaciones caninas con drogas tenífugas y a partir de 1975 se incorpora el **tenicida praziquantel**, en la totalidad de los programas de control en ejecución. Con la educación sanitaria de la población expuesta al riesgo de enfermar, el control de la faena y la desparasitación periódica de los perros domésticos, se logró erradicar la EQ en ámbitos insulares, como Islandia, Tasmania y Nueva Zelandia**,** pero en áreas continentales de Sudamérica, "**no se pudieron repetir estos logros"**. De las medidas existentes para prevenir enfermedades infecciosas, la vacunación es la más útil. Las vacunas constituyen un medio eficaz y rentable para prevenir y controlar, o incluso erradicar, enfermedades infecciosas. Si previenen infecciones zoonóticas, las vacunas veterinarias pueden proteger no sólo la salud de los animales, sino también la del hombre. La disponibilidad de la vacuna EG95, a escala industrial, abre una nueva perspectiva que, sumada al resto de las medidas de control que cada programa ejecuta, podrían acelerar los tiempos para evitar que se sigan enfermando tanto el ganado, como los seres humanos.

PALABRAS CLAVES: Zoonosis, Hidatidosis, Equinococosis, Vacuna, EG95.

EG95 RECOMBINANT VACCINE IN INTERMEDIATE HOSTS

THE LONG ROAD IN THE SEARCH FOR A VACCINE TO PREVENT HYDATIDOSIS. FROM RESEARCH TO ITS APPLICATION IN CONTROL PROGRAMS. (1927 - 2016)

ABSTRACT: Cystic echinococcosis (CE) is a controllable zoonosis. The cycle of the parasite has been known since 1853 and it was during 1864 that health education and slaughter control campaigns began in some regions of the world in order to try to prevent the disease. In 1890, canine deworming with tenifuge drugs began and as of 1975 the pesticide praziquantel was incorporated into all the control programs underway. With the health education of the population exposed to the risk of becoming ill, the control of slaughter and the periodic deworming of domestic dogs, CE was eradicated in island areas, such as Iceland, Tasmania and New Zealand, but in continental areas of South America, "these results could not be repeated". Of the existing measures to prevent infectious diseases, vaccination is the most useful. Vaccines are an effective and cost-

effective means of preventing and controlling, or even eradicating, infectious diseases. By preventing zoonotic infections, veterinary vaccines can protect not only the health of animals, but also that of man. The availability of the EG95 vaccine, on an industrial scale, opens a new perspective that, added to the rest of the control measures that each program executes, could speed up the times to prevent both cattle and humans from becoming.
KEYWORDS: Zoonosis, Hydatidosis, Echinococcosis, Vaccine, EG95.

1 I INTRODUCCION

La echinococcosis quística (EQ) es una zoonosis **controlable**. El ciclo del parásito se conoce desde el año 1853 y fue durante el año 1864 que se inician en algunas regiones del mundo campañas de educación sanitaria y control de faena con el fin de intentar prevenir la enfermedad. En el año 1890 se iniciaron las desparasitaciones caninas con drogas tenífugas y a partir de 1975 se incorpora el tenicida praziquantel, en la totalidad de los programas de control en ejecución.

En Argentina, en el año 1906, un decreto firmado por el presidente José Figueroa Alcorta, planteó medidas de prevención y control. En la década del 70 se inician los programas de control de la Hidatidosis en Neuquén y Tierra del Fuego y a partir de la década del 80 en las provincias del Chubut y de Río Negro. Con posterioridad se empiezan a realizar acciones de control en otras provincias argentinas. La mayoría de los programas fueron implementados desde el sector Salud de las provincias, con apoyo del Ministerio de Salud de la Nación.

A pesar de los esfuerzos técnicos y económicos realizados en el país y aún con el apoyo de distintos organismos sanitarios internacionales, la EQ sigue siendo en Argentina un serio problema socioeconómico. El Ministerio de Salud reporta altas tasas de EG, lo que la ha transformado en la zoonosis con mayor cantidad de casos registrados. Es considerada por la Organización Panamericana de la Salud y la Organización Mundial de la Salud, como una de las zoonosis desatendidas en las poblaciones postergadas.

Con la educación sanitaria de la población expuesta al riesgo de enfermar, el control de la faena y la desparasitación periódica de los perros domésticos, se logró erradicar la EQ en ámbitos insulares, como Islandia, Tasmania y Nueva Zelandia**,** pero en áreas continentales de Sudamérica, "**no se pudieron repetir estos logros"**.

A mediados de la segunda década del siglo XXI, lamentablemente se siguen enfermando ovinos, caprinos, bovinos, cerdos y llamas, afectando la economía ganadera y manteniendo la oferta de quistes hidatídicos para perpetuar el ciclo de la EQ. Siguen contrayendo la enfermedad las personas, fundamentalmente los niños, no solo en Argentina sino también en otras regiones del mundo (Jensen 2002; Jensen 2006).

De las medidas existentes para prevenir enfermedades infecciosas, la vacunación es la más útil. Las vacunas constituyen un medio eficaz y rentable para prevenir y controlar, o incluso erradicar, enfermedades infecciosas. Si previenen infecciones zoonóticas, las

vacunas veterinarias pueden proteger no sólo la salud de los animales, sino también la del hombre.

La disponibilidad de la vacuna EG95, a escala industrial, abre una nueva perspectiva que, sumada al resto de las medidas de control que cada programa ejecuta, podrían acelerar los tiempos para evitar que se sigan enfermando tanto el ganado, como los seres humanos.

2 I INMUNIDAD EN EL HOSPEDADOR INTERMEDIARIO

Echinococcus granulosus infecta sus hospederos en formas diversas y con algunas variaciones en su ciclo vital. La variabilidad de hospederos intermediarios y de órganos afectados puede influir en la respuesta inmunitaria del hospedador al parásito. Las formas parasitarias que pueden desencadenar esta respuesta inmunitaria en el hospedero intermediario son la oncósfera invasora, el quiste hidatídico maduro y los protoescólices liberados después de la rotura del quiste hidatídico. Algunos aspectos generales de las características inmunobiológicas de la infección por céstodos taenidos en el hospedero intermediario son comunes del grupo e incluyen los aspectos siguientes. (Lightowlers, 1994).

a.- La inmunidad interviene de modo fundamental en la regulación natural de la transmisión. Los sujetos infectados muestran inmunidad intensa contra la reinfección. b.- Los hospederos pueden ser protegidos contra la infección inicial por inmunización con extractos de parásitos inactivados. c.- Los hospederos pueden ser protegidos contra la infección inicial por transferencia pasiva de suero de un hospedero infectado o un hospedero anteriormente inmunizados activamente. d.- Existe un alto grado de reactividad cruzada entre antígenos de diferentes especies de taenias y se reflejó tanto en la inmunización activa como en la transferencia pasiva de inmunidad utilizando antígenos o suero inmune de especies heterólogas. e.- Los anticuerpos en el calostro transfieren la protección de las hembras infectadas a sus crías. También puede transferirse la inmunidad a receptores no infectados por medio de sueros o anticuerpos purificados obtenidos de animales infectados. f.- La vacunación con extractos parasitarios sin refinar genera niveles altísimos de protección contra las reinfecciones. g.- El calostro, el suero de la madre o la transferencia de anticuerpos de los animales vacunados protege a los receptores contra nuevas infecciones.

Gran parte de la información inicial sobre la vacunación contra infecciones por cestodos y sus hospederos intermediarios ha sido producto de estudios detallados en que se utilizó *Taenia taeniaeformis*, y esta especie ha seguido usándose como un modelo útil para investigaciones sobre vacunación contra este grupo de parásitos. (Lightowlers, 2003).

3 I LA VACUNA EN LOS HOSPEDEROS INTERMEDIARIOS

La vacuna ideal, debería permitir inmunizar a hospedadores intermediarios de corta edad mientras aún están protegidos por los anticuerpos que recibieron de sus madres y mantener los niveles de protección con un refuerzo anual.

Es necesario un nivel alto de anticuerpos para destruir cualquier nueva oncósfera que invada el organismo. Si una nueva oncósfera invade el organismo y necesita estimular las células de memoria para producir anticuerpos, cuando éstos estén disponibles, la oncósfera ya se transformó en quiste hidatídico y no será afectada. Los hospedadores intermediarios deben tener anticuerpos circulantes suficientes para matar la oncósfera que pudieran ingerir cuando los animales pastan en ambientes contaminados con materia fecal canina y huevos de *E. granulosus.*

4 I EL LARGO CAMINO RECORRIDO EN LA BUSQUEDA DE UNA VACUNA CONTRA EL PARASITO ECHINOCOCCUS GRANULOSUS

En 1796, Edward Jenner (1749–1823), investigador, médico rural y poeta inglés, realizó la primera inoculación contra la viruela, enfermedad que causaba estragos en el mundo. Un niño de ocho años, fue el primer inoculado con secreción recogida de una pústula vacuna (viruela de vacas) en la mano de una lechera que se había infectado durante un ordeñe. Semanas después inoculó de nuevo al pequeño, esa vez con pus procedente de una persona enferma de viruela. El niño quedó indemne, con lo cual se demostró la acción profiláctica de la inoculación contra la viruela humana. E. Jenner nunca imaginó que su descubrimiento salvaría millones de vidas. Dos siglos más tarde, las vacunas siguen siendo una herramienta fundamental en la lucha contra las enfermedades infecciosas.

a.- La vacuna con líquido hidatídico y protoescólices

En 1927, Félix Agustin Dévé (1872-1951), médico e hidatidólogo francés, describió sus intentos de producir inmunidad artificial experimental, contra *E. granulosus* en conejos. Los conejos fueron inmunizados con la inyección de líquido hidatídico y arena hidatídica de ovejas. Tres meses después del desafío, se encontraron quistes a la observación microscópica (Dévé, 1927).

En la década del 30, Edward L. Turner, E.W. Dennis y D.A. Berberian, del Departamento de Medicina y Parasitología, de la Universidad Americana de Beirut, estudian la posibilidad de producir inmunidad artificial contra *E. granulosus*, en hospederos intermediarios y definitivos. En 1937 publicaron una vacuna experimental en ovejas. Preparan el antígeno con escólices y membranas de quistes del pulmón ovino, llevado a fino polvo por desecación. Inician el trabajo con 70 ovejas preñadas. Sus corderos son inmunizados con 1, 2, 3 y 4 dosis de vacuna aplicada en forma intramuscular. Trabajan con 115 corderos. Vacunados

y controles son desafiados vía oral con 500 y 1000 oncósferas, obtenidas de materia fecal canina. Pasados entre 11 y 12 meses fueron realizadas las necropsias, observándose hígado, pulmón, bazo y riñones. En los quistes de los animales inmunizados se observó paredes engrosadas, calcificación temprana, degeneración de membrana y escólices degenerados. Los resultados obtenidos mostraron que el procedimiento de inmunización no previno la infección, pero si redujo el número de quistes y su tamaño (Turner, 1937)).

Ni Félix Dévé en Francia en 1927, ni Turner y col en Beirut en la década del 30, ni Velarde Perez Fontana en Uruguay en la década del 40, ni Dada y Belino en Nigeria y ni Adrian Bisch en Argentina en la década del 80, logran obtener resultados satisfactorios inyectando antígenos derivados de líquido hidatídico o protoescólices.

b.- La vacuna con huevos y con extractos de oncósferas

Michael Gemmell del Hydatid Research Unit de New Zeland, realizó investigaciones en inmunidad relacionadas con *E. granulosus* en tres estudios realizados en 1964 y 1965. Vacunó en forma intramuscular corderos con huevos y oncósferas, como antígeno bruto, obtenidos de *E. granulosus, de Taenia hydatigena y T. ovis* de ovinos y de *T. pisiformis* de conejos. Los corderos fueron desafiados posteriormente con los huevos de *E. granulosus*. Se establecieron quistes hidatídicos en los animales vacunados con *Taenia*s. Los huevos o oncósferas de *E. granulosus* fueron capaces de inducir una respuesta inmune fuerte (Gemmell, 1966)).

Junto a Soulsby de la Universidad de Pennsylvania, USA en 1996, realizan una revisión sobre el desarrollo de la inmunidad adquirida y el progreso en la inmunización activa. Definen que los próximos estudios deberían conducir a una mejor comprensión de la reacción antígeno-anticuerpo y sus consecuencias sobre la relación huésped-parásito. Platean que investigaciones dirigidas hacia el aislamiento y la caracterización de los antígenos funcionales pueden conducir al desarrollo de vacunas, para uso en programas de salud pública (Gemmell, 1968)).

En 1970, el neozelandés David Heath presenta su tesis doctoral en la Universidad Nacional de Australia sobre la biología del desarrollo de las formas larvales de las *Taenias* que causan EQ y cisticercosis en los mamíferos.

David Heath en la década del 80, junto a Parmeter, Osborn y Lawrence y junto a Osborn demostró un alto nivel de resistencia a la infección oral con huevos de *E. granulosus*, en corderos de raza Romney Marsh de Nueva Zelandia, inmunizados con homogenato de oncósferas. El suero de estos animales inhibió el desarrollo de quistes hidatídicos in vitro. Con la vacunación a base de oncósferas lograron obtener niveles altísimos de protección en ovejas contra la infección con huevos. Dos aplicaciones subcutáneas o más, de oncósferas activadas de *E. granulosus* estimularon la aparición de protección casi completa contra infecciones repetitivas. Las inmunizaciones culminaron con la aparición de masas de quistes en el sitio de la inyección inicial, pero no se observaron tales estructuras en el sitio

en el cual se hicieron las nuevas aplicaciones de oncósferas. Las oncósferas activadas o alguna fase en el desarrollo de parásito antes de los 14 días de vida, estimulan resistencia. (Heath, 1981, Osborrn, 1982).

Estos resultados de alta relevancia científica dieron origen al desarrollo posterior de una vacuna formulada **con extractos de oncósferas** del parásito.

El australiano Marshall Lightowlers inicia sus trabajos en inmunología de *T. taeniaeformis* en ratones, como paso previo a una posible vacuna contra *E. granulosus*

La limitante principal de la aplicación práctica de las vacunas para controlar la parasitosis producida por *E. granulosus*, reside en el abastecimiento y la disponibilidad del antígeno. La fuente más potente del antígeno para las vacunas es la oncósfera. Es impráctico considerar, salvo en estudios experimentales, que se podrá contar con suficiente antígeno, preparado desde las oncósferas. Para desarrollar una vacuna de distribución masiva, es esencial identificar los antígenos protectores específicos en la oncósfera de *E. granulosus* (Lightowlers, 1966).

c.- La vacuna recombinante

La tecnología de ADN recombinante permite aislar los genes que codifican la información de las proteínas de interés inmunológico presentes en el patógeno contra el cual queremos desarrollar una vacuna. El gen en cuestión insertado en un vector de clonado contendrá la secuencia de ADN que se desea replicar. De esta manera éste ADN puede incorporarse a las células de otros organismos (bacterias, levaduras, células animales, vegetales) en los que se podrá “expresar” la información de dichos genes obteniéndose grandes cantidades de la proteína en cuestión con fines biotecnológicos.

En 1989, en Nueva Zelandia, se produjo una vacuna a base de antígenos recombinantes, contra la infección por *T. ovis* en ovinos. Fue la primera vacuna recombinante, muy satisfactoria, con eficacia a campo y registrada para la distribución comercial, contra una parasitosis.

Marshall Lightowlers a fines de los 80 y en los inicios de la década del 90 realiza la primera publicación acerca de la creación de una vacuna contra *E. granulosus*, en base a la vacuna contra *T. Ovis*.

La vacuna denominada EG95 fue desarrollada por Marshall Lightowlers, David Heath y colaboradores. Se trata de una proteína recombinante de 16 kDa clonada a partir del ácido ribonucleico mensajero (RNAm) obtenido de huevos del parásito que, expresada como una proteína de fusión con glutation S-transferasa (EG95-GST) dando como resultado un producto de 40 kDa. La proteína EG95 emulsionada con el adyuvante Quil A, protege frente a la infección por *E. granulosus* al inducir anticuerpos específicos del tipo IgG1 e IgG2 contra la oncósfera del parásito. A través de este mecanismo inmunológico el parásito es eliminado cuando ocurre la infección, antes de poder establecerse en los tejidos del huésped. Es una preparación proteica purificada, no infecciosa, no tóxica, no contaminante,

cuya proteína recombinante EG95 se expresa en *Escherichia coli.*

En 1993, Heath y Lightowlers presentan: "**El desarrollo exitoso de una vacuna recombinante frente a la enfermedad hidatídica**" en el 16º Congreso Internacional de Hidatidologia que se realizó en Pekín, China, donde informan a la comunidad científica que desarrollaron una vacuna que protege a los ovinos contra la infección por *E. granulosus*. Dos inmunizaciones de 50μg de antígeno produjeron una protección del 96% frente al desarrollo de quistes hidatídicos, protegiendo a los diez ovinos vacunados ante el desafío con huevos de *E. granulossus*, frente a los ocho ovinos controles.

En 1996, David Heath y Stephen Lawrence publican la identificación de la molécula antigénica EG95 en oncósferas maduras. Definen la secuencia de los polipéptidos antigénicos de la oncósfera que inducen respuesta inmune de anticuerpos, su asociación con la aparición temprana de protección y la lisis de las oncósfera in vitro por la presencia de dichos anticuerpos séricos. Demostraron la relevancia de antígenos nativos de 23, 25, 30, 34 y 40 kDa en la respuesta inmune protectora contra la infección por *E. granulosus*. La confirmación final fue proporcionada por la inmunización de ovinos y su posterior desafío con el parásito. Sólo la fracción de peso molecular en el rango de aproximadamente 23-25 kDa (proteínas EG95), incluyendo los aminoácidos 4 a 77, fue capaz de generar una respuesta inmunológica del tipo IgG que resultó protectora contra la infección por *E. granulosus* (Heath, 1966).

EG95 es una proteína presente en diferentes estadíos de *E. granulosus* que tiene una función vital en la biología del parásito. Puede estar implicada en la penetración de los parásitos al epitelio de las vellosidades intestinales. Esta proteína tiene alto grado de conservación en diferentes etapas del desarrollo de *Echinococcus*. El gen que codifica EG95 se expresa en oncósferas, protoescólices y gusanos adultos inmaduros y maduros.

El antígeno protector puede producirse mediante aislamiento de la oncósfera de *E. granulosus* nativo utilizando técnicas de purificación convencionales. Para la producción del antígeno en cantidades industriales, es deseable la producción por técnicas de ADN recombinante.

Con el avance de la ingeniería genética, el equipo liderado por Marshall Lightowlers de la Universidad de Melbourne (Australia) y David D Heath de Ag Research (Nueva Zelandia) lograron clonar el antígeno EG95 en un plásmido vector y expresar la proteína de interés inmunológico en la bacteria *Escherichia coli*. Junto a Laurence, Gauci, Young, Ralson y Maas, en 1966, describen el desarrollo de una vacuna basada en un antígeno recombinante clonado a partir de los huevos de parásitos (oncósfera). Ovinos vacunados con el antígeno designado EG95, fueron protegidas (media 96-98%) contra la EQ luego de la infección en prueba experimental con huevos de *E. granulosus*.

Los ensayos establecieron que la cantidad de antígeno necesario era de 50 mg de proteína EG95 para ovinos y caprinos y mostraron que Quil A fue el adyuvante disponible que promovió el nivel más alto y la mayor persistencia de la protección, con una mínima

reacción en el sitio de la inyección a una dosis de 1 mg. Utilizando el doble de la dosis recomendada superó las pruebas sobre posibles signos de reacciones locales, sistémicas y efectos sobre comportamiento. No se registró aumento de temperatura, reacciones en el sitio de inyección, efectos adversos ni alteraciones del comportamiento significativos al vacunar corderos entre 4 semanas y 8 semanas de edad y hembras en período de gestación. La vacuna se presenta liofilizada y es reconstituida antes de su aplicación, con la finalidad de prolongar su tiempo de almacenaje. Esta vacuna podrá incorporarse a otras vacunas clostridiales, bacterianas o antiparasitario, pero se perderá la capacidad de ser liofilizada.

La vacuna EG95, la primera vacuna recombinante contra EQ, será una nueva herramienta para su control.

5 I LA INCORPORACION DE ARGENTINA A LOS ESTUDIOS CON LA VACUNA EXPERIMENTAL EG95

Marshall W. Lightowlers integra el "Grupo Científico de Trabajo sobre los adelantos en la prevención, el control y el tratamiento de la Hidatidosis" de la organización Mundial de la Salud, y publican: "*Infecciones por Echinococcus: Aspectos inmunobiológicos y de vacunación",* en 1.994.-

El documento describe los resultados de dos investigaciones independientes, que usaron el antígeno recombinante de oncósferas para vacunar a los ovinos contra infecciones subsecuentes por huevos de *E. granulosus* logrando protecciones del 95% y 97% de protección. En el manifiestan que: *"La investigación por colaboración entre el laboratorio de Parasitología Molecular de la Universidad de Melbourne y Ag Research de Nueva Zelandia han permitido la elaboración de una vacuna definida que protege a los ovinos contra infecciones repetitivas por E. granulosus. Es posible utilizar la vacuna como un medio para controlar la transmisión de los parásitos hidatídicos, en sus huéspedes intermediarios naturales, como parte de las campañas de lucha contra la hidatidosis".* En la parte final del documento escriben: "*La Universidad de Melbourne y el organismo Ag Research investigan la participación de las compañías comerciales en el refinamiento de la vacuna. Además, será de máxima importancia la colaboración de otros grupos de investigadores que tengan interés en la epidemiología y la lucha contra la enfermedad hidatídica, en la valoración de la vacuna en forma directa "sobre el terreno", y seguramente será bien recibida".*

En 1995 el grupo de investigadores integrado por el Bioquímico Eduardo Fernández, el Médico Jorge Lago y los Veterinarios Jorge Iriarte y Oscar Jensen, profesionales del Ministerio de Salud de la Provincia del Chubut de Argentina, reciben el protocolo y 10 dosis de vacuna experimental EG95 en forma liofilizada, desde la Universidad de Melbourne, Australia. En la chacra Nª 18 de Sarmiento, perteneciente a la Dirección de Ganadería,

Eduardo Fernandez y Oscar Jensen, vacunan los primeros corderos en América. (Lightowlers 1999).

En 1997 se incorpora el Centro Regional de Investigación y Desarrollo Científico Tecnológico (CRIDECIT), de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, con el grupo de la Dra. Paula Sanchez Thevenet.

6 I LOS ENSAYO CON LA VACUNA EG95 EN LA DECADA DE LOS 90

Se realizaron ensayos en estudios experimentales multicéntricos, controlados y aleatorios, bajo un mismo protocolo, en Australia, Nueva Zelandia, China y Argentina. Los resultados de potencia de la vacuna recombinante en ensayos a campo realizados fueron similares y concluyentes, con protección logradas en los animales vacunados respecto a los controles, entre 83% y 99%, para los ensayos con dos dosis de vacuna EG95.

Ensayos realizados en China y en Argentina con animales que recibieron dos dosis de vacunas, con 1 mes de intervalo, y luego desafiados a los 6 y 12 meses posteriores, se logró una protección entre el 82 y 97%. En ensayos realizados en Argentina con una sola dosis y el desafío realizado a los 5 y 12 meses, se logró un 82 y 85 % de protección. En un ensayo realizado en Argentina con 3 dosis se logró una protección del 100%. La tercera dosis logra un nivel más alto de anticuerpos y una mayor protección.

7 I ENSAYOS CON LA VACUNA EG95 EN ARGENTINA

Periodo 1995 – 1999

Los animales de los ensayos fueron corderos de menos de 25 semanas, no expuestos a la infección por *E. granulosus*, que siguieron el calendario sanitario del establecimiento donde se realizó el ensayo. La vacuna liofilizada provista por Marshall W. Lightowlers de la Universidad de Melbourne, fue reconstituida una hora antes con agua destilada y aplicada en forma subcutánea en la ingle y/o la axila, a la dosis de 50 ug de la proteína EG95 y 1 mg de adyuvante Quil A, en un volumen de 2 ml. Los corderos vacunados y testigos fueron desafiados por vía oral con aproximadamente 2.000 huevos de *E. granulosus*, obtenidos de perros naturalmente infectados, según el protocolo de cada ensayo. Entre los 8 y 14 meses de producida la infección, los ovinos fueron sacrificados bajo condiciones que permitieron el examen detallado de la res y de las vísceras, especialmente el hígado, los pulmones, los riñones, el bazo y el cerebro, que se cortaron en trozos de 1 a 2 mm, en búsqueda de quistes hidatídicos.

Ensayo Argentina Nº 1 – Chubut – Sarmiento - 1995: Se inicia en mayo de 1995, con 20 corderos de raza Merino. Diez fueron protegidos con dos dosis de vacuna EG95 con 4 semanas entre ambas dosis. Todos fueron desafiados 4 semanas después. Transcurridos 14 meses de efectuada la infección, todos los ovinos que finalizaron la prueba, (7 del

grupo vacunado y 10 testigos), fueron sacrificados en búsqueda de quistes hidatídicos. En el 100% de los animales testigos (10/10), se encontraron quistes hidatídicos. Fueron detectados 232 quistes hidatídicos. En el grupo vacunado, un ovino (1/7), presentó un (1) quiste hidatídico viable, de 2 mm. La protección resultante fue del 99.4 %.

*Lightowlers, Jensen, Fernández y col., publican en 1.999: sobre tres ensayos realizados en ovejas inmunizados con la vacuna experimental recombinante EG95 y desafiados con huevos de E. granulosus viables obtenidos en Nueva Zelandia (ciclo perro / oveja), Australia (ciclo dingo / canguro) y Argentina (ciclo perro / oveja). La vacunación con EG95 confiere un alto grado de protección (rango 96-100% de protección). Los ensayos demostraron que el 86% de las ovejas vacunadas eran completamente libres de quistes hidatídicos viables cuando se examinan aproximadamente 1 año después del desafío. La vacunación redujo el número de quistes viables por 99 % en comparación con los controles no vacunados. Estos resultados sugieren que la vacuna EG95 podría tener una amplia aplicación como una nueva herramienta para su uso en campañas de control de hidatidosis (*Lightowlers, 1999).

Ensayo Argentina Nº 2 - Chubut – Puesto Blanco - 1996. Se inicia en mayo de 1996, con 20 corderos de raza Merino, de 6 meses de edad, en un campo de 2.500 hectáreas. Diez fueron protegidos con tres dosis de vacuna EG95. Todos fueron desafiados. En el grupo testigo se encontró una media de 92 quistes hidatídicos. En el grupo vacunado no se encontraron quistes. La protección resultante fue del 100%. -

Ensayo Argentina Nº 3 - Chubut – Estancia Media Luna - 1997. Se inicia en abril de 1997, con 90 corderos, raza Merino de 6 meses de edad. El objetivo fue evaluar el número de dosis y tiempo de protección. Sesenta corderos fueron protegidos con una dosis de vacuna EG95 y treinta de ellos recibieron una segunda dosis a los 45 días. Treinta quedaron como testigos. Se realizaron desafíos en distintos grupos y tiempos. En los testigos examinados se encontraron una media de 219 quistes. Con una sola dosis de la vacuna se logró una protección del 85 % para la infección con *E. granulosus* a los 3 meses de la última dosis y del 82% a los 12 meses. Con dos dosis de vacuna resultó una protección del 99% para 4 meses y del 98% para 11 meses post vacuna.

Ensayo Argentina Nº 4 - Chubut – Sarmiento - 1997: Se inició en mayo del 97, en un lote de 10 ovejas de raza Texel, servidas en el otoño. El objetivo fue evaluar la transferencia calostral de inmunidad. Las madres fueron protegidas con dos dosis de vacuna EG95 y fueron desafiados sus corderos con 2.000 huevos de *E. granulosus*. La protección resultante fue del 98% hasta los 40 días de vida de los corderos.

Ensayo Argentina Nº 5 - Chubut – Sarmiento - 1999: Se inicia en la primavera de 1.999 con ovejas de raza Texel previamente vacunadas. El objetivo fue evaluar la interferencia de la inmunidad calostral. Se estudiaron los calostros, los sueros de sus corderos y los sueros de corderos hijos de madres no vacunadas. Todos los corderos fueron vacunados con una dosis de EG95, a los tres meses. Por un ensayo k-Elisa se evaluaron

los sueros para determinar los niveles de actividad anticuerpo y por un ensayo inmunoblot los sueros y el calostro para revelar actividad anti-EG95. La inmunidad calostral no interfirió con la respuesta de anticuerpos en los corderos vacunados.

En 1997 ya se tenían resultados alentadores, que se confirmaron al finalizar las distintas experiencias, a fines del año 1999. A fines del siglo veinte, luego de concluir con éxito los ensayos de Australia, Nueva Zelandia y Argentina, se contaba con una excelente vacuna experimental.

8 I ENSAYOS CON LA VACUNA EXPERIMENTAL EN EL NUEVO SIGLO

Ensayo Argentina Nº 6 - Neuquen Junín de los Andes - 2001: Se inició en mayo de 2001, con 40 caprinos, raza Angora de 6 meses de edad, divididos en cuatro grupos, en un establecimiento rural cercano a Junín de los Andes, en el marco del convenio de cooperación científica entre el Ministerio de Desarrollo Social de la Provincia de Neuquén y el Ministerio de Salud de la Provincia del Chubut. El objetivo fue evaluar en caprinos, la vacuna recombinante EG95, bajo condiciones controladas. Los grupos a, b, y c fueron protegidos con una y dos dosis de vacuna Eg95 producida en 2001, 1999 y 1997 respectivamente y conservadas en forma liofilizada a 4 Cº. - Fueron desafiados por vía oral con aproximadamente 2.000 huevos de *E. granulosus*, obtenidos de perros naturalmente infectados, de la zona sur de Neuquén.

Se comparó la respuesta de anticuerpos anti *E. granulosus* obtenida en caprinos vacunados con EG95, en sueros caprinos que recibieron dos dosis de vacuna EG95, comparados con sueros ovinos de misma características y tiempos, mediante IgGk-ELISA y Western Blot. Los resultados obtenidos demuestran la presencia de anticuerpos protectivos contra *E. granulosus* en caprinos vacunados, comparable a lo demostrado en ovinos.

A la necropsia no se encontraron quistes hidatídicos en los caprinos vacunados con dos dosis y se encontraron quistes hidatídicos (12 en pulmón y 1 en hígado) en el 15% de los caprinos con una dosis. Se encontraron quistes hidatídicos (159 en pulmón y 65 en hígado) en el 90% de los no vacunados. Los niveles de protección fueron similares a los detectados en ovinos y no se encontraron diferencias significativas en el nivel de protección entre la vacuna producida en 1997, 1999 y 2001.-

Ensayo Chile. Región del Bío-Bío - Chillan: En año 2003 se evalúa un ensayo realizado en la Facultad de Veterinaria de Chillán, ubicado en la VIII región de Chile, realizado en ovinos de raza Suffolk que a la edad de corderos recibieron dos dosis de vacuna EG95 con el adyuvante Quil A, producida en el Ag Reserch de Nueva Zelandia, realizándose el desafío con proglótidos de *E granulosus* obtenidos de perros de la región del Alto Bío Bío. A la necropsia, realizada 13 meses después de la segunda dosis, se detectan 291 quistes en los 10 ovinos testigos y 3 quistes en los doce ovinos vacunados (Vivallo, 2004).

Ensayo	País	Año	Especie	Número animales	Objetivos	Número dosis	% protección
1	Argentina	1995	Ovino	20	Protección vacunal	2	99
2	Argentina	1996	Ovino	20	Protección vacunal	3	100
3	Argentina	1997	Ovino	60	Numero dosis	1	85
3	Argentina	1998	Ovino	30	Numero dosis	2	98
4	Argentina	1997	Ovino	10	Inmunidad calostral	2	98
5	Argentina	2001	Caprino	20	Protección vacunal	1	84
5	Argentina	2002	Caprino	20	Protección vacunal	2	98
6	Chile	2003	Ovinos	20	Protección vacunal	2	99

Tabla I. Ensayos realizados con la vacuna experimental EG95 en Argentina y Chile.

Heath, Jensen y Lightowlers, en el año 2003, publican una revisión sobre la formulación, aplicación de la vacuna, el progreso en el control de la Hidatidosis, realizando recomendaciones para el uso en los programas de control. Describen la vacuna EG95, que protege a las ovejas, las cabras y bovinos contra la hidatidosis. Describe el trabajo realizado en la formulación, la seguridad, la eficacia de la vacuna, su esquema de aplicación, número de dosis, los desafíos y las necropsias. Describe las dificultades en áreas continentales de los programas que utilizan la desparasitación de los perros. Plantean la utilidad de realizar dos visitas al año a cada establecimiento, realizando la desparasitación de los perros y la vacunación del ganado. Advierten que la vacuna no tiene efecto sobre los quistes establecidos y es esperable que la infección aumenta con la edad.

Concluyen que una estrategia eficaz es comenzar un programa de control mediante la vacunación de todos los animales y que debe ir acompañado de la educación sobre la hidatidosis y el tratamiento antihelmíntico de los perros al menos dos veces en el año (Heath, 2003).

9 I LA VACUNACION EN HUMANOS CONTRA LA ENFERMEDAD HIDATIDICA

Al finalizar el siglo veinte, Marshall Lightowlers en un documento de discusión sobre *"La vacunación de los seres humanos contra la hidatidosis*", plantea para las regiones donde no sea posible aplicar la vacuna en los animales o no se puedan ejecutar medidas de control, la necesidad de disponer de una vacuna que se aplique directamente en el hombre. En su opinión, la vacuna de uso animal tendría un excelente potencial para desarrollar la primera vacuna humana eficaz contra una enfermedad parasitaria.

En el año 2000 *Lightowlers, Flisser, Gauci y col., realizan una revisión sobre los progresos de la vacuna contra hidatidosis en los ovinos y la cisticercosis en los bovinos. Tal éxito en los animales fomenta la investigación de la utilización potencial de las vacunas en seres humanos para prevenir la enfermedad hidatídica derivada de la infección por E. granulosus* (Lightowlers, 2000*).*

En sintonía con dicha intención, el Ministerio de Salud de la Provincia del Chubut

elabora en el año 2000, y a través del Departamento de Zoonosis conducido por el Méd. Vet. Jorge Iriarte, un proyecto tendiente a solicitar cooperación técnica y financiera para desarrollar una vacuna de uso humano que evitara la enfermedad en la Patagonia. El proyecto partía de la base que las dificultades existentes para controlar la enfermedad mediante los métodos habituales tales como la educación sanitaria, la desparasitación de canes, el control de faena, aconsejaban avanzar en una investigación para encontrar una vacuna que dotara de inmunidad a la población humana susceptible de contraer la enfermedad, fundamentalmente los niños de corta edad. La propuesta, que llegó a ser analizada en el propio Ministerio de Salud de la Nación, nunca logró el financiamiento requerido.

10 I LA VACUNA EXPERIMENTAL EN LOS PROGRAMAS DE CONTROL

Con la vacuna experimental producida en el Ag Research de Nueva Zelandia y en la Universidad de Melbourne de Australia se realizaron ensayos en el marco de los programas de control de Hidatidosis:

a.- China 1996. Vacunación a gran Escala: David Heath realiza un ensayo a gran escala, a campo con desafío natural, en las provincias Qinghai y Xinjiang de China, vacunando 50.000 y 100.000 corderos. La vacuna EG95 protegió al menos 1 año luego de 2 vacunaciones, mientras que 3 vacunaciones pueden proteger 3 ó 4 años. Confirmó la seguridad y eficacia de la vacuna.

b.- Argentina, Chubut. El Chalia. (2007–2013). Vacunación de Ovinos y Caprinos: En la colonia aborigen “El Chalia”, ubicada al suroeste de la Provincia del Chubut, se realizó un ensayo a campo, utilizando la vacuna experimental EG95 provista en forma liofilizada por la Universidad de Melbourne de Australia, con el objetivo de evaluar la vacuna como herramienta de control. A la colonia aborigen, entre los años 1984 y el año 2015, la habitaron un promedio de 20 familias de origen mayoritariamente tehuelche, que en conjunto pastorearon un promedio de 1.500 caprinos y 10.000 ovinos en 30.000 hectáreas. Mantuvieron un promedio de 100 perros, mayoritariamente de razas ovejeras.

En 1984 el programa de control de Hidatidosis, que depende del Ministerio de Salud, inicia en el sur de la provincia del Chubut, sus actividades de control, basadas en la desparasitación periódica de los perros y la educación sanitaria de la población. En la colonia “El Chalia”, en el diagnóstico inicial, mediante la prueba de la arecolina, se detecta que el 55% de los perros tenía el parásito que produce EQ y encuentran perros parasitados en el 73% de las viviendas. El programa de control de la Hidatidosis de la provincia del Chubut, realizó tareas de desparasitación canina y educación sanitaria, en forma ininterrumpida desde el año 1984 al año 2007.

Al inicio del programa de vacunación en diciembre de 2007, el 25% de los perros tenía *E. granulosus s.l.* y había perros parasitados en el 72% de la vivienda, medidos por

la prueba de la arecolina. En el verano, en coincidencia con los trabajos de esquila y los baños sanitarios obligatorios, se realizó la aplicación de la vacuna, a cargo del Ministerio de Salud, contando con la colaboración de técnicos de Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (Senasa). En las 7 temporadas de vacunación se tuvieron dificultades para vacunar los ovinos y los caprinos, de todos los establecimientos. También para vacunar todos los ovinos y caprinos, de cada establecimiento: también para aplicar las dos dosis a corderos y chivos. En la última evaluación de la situación hidatídica de la colonia "El Chalia", realizada dos años después de finalizado el programa de vacunación, en abril de 2015, por la prueba de la arecolina se encontraron dos perros (2%) con *E. granulosus s.l.*, que pertenecía a dos (11%) viviendas.

Año	Herramientas de control aplicada	Prueba Arecolina	% Perros con Eg	% Viviendas con perros con Eg
1984 / 2006	Desparasitación. Educación	1984	55	73
2007 / 2013	Desparasitación. Educación. **Vacunacion de ovinos y carpinos**	2007	25	72
2014 / 2015	Desparasitación.	2015	2	11

Tabla 2. Medidas de control en la colonia aborigen "El Chalia", período 1984 / 2015.

La vacuna fue eficaz para evitar que en los ovinos y caprinos se desarrollen quistes hidatídicos y que luego de la faena domiciliaria los perros desarrollen *E. granulosus s.l.*, al ingerir sus vísceras.

c.- Argentina Río Negro. (2009 – 2015), Vacunación de Ovinos: En el año 2009 la provincia de Río Negro inicia un ensayo de control con vacuna producida en la Universidad de Melbourne, de Australia, con el objetivo de evaluar el impacto de la introducción de la vacuna EG95 en la interrupción del ciclo de transmisión y analizar la factibilidad técnico operativa de su aplicación en condiciones de campo. El programa se aplica en el sur de la Provincia de Río Negro en un área con cuatro comunidades aborígenes, estableciendo un área vecina y de similares características como área control, donde no se aplicó la vacuna.

El programa de control con la vacuna incluye solo al ganado ovino, quienes recibieron dos dosis como cordero y una sola dosis de refuerzo a 1-1,5 años de edad. Se logra una reducción estadísticamente significativa del 62% en la prevalencia de la infección, en el número de granjas infectadas, en el número de quistes / animal infectado, en el tamaño de los quistes de los animales vacunados en comparación con los controles no vacunados de la misma edad. Se plantea las dificultades encontradas para aplicar la vacuna y se concluye que la vacuna fue capaz de prevenir la infección (Larrieu, 2013; Larrieu, 2015).

11 I LA BUSQUEDA DE UN LABORATORIO PRODUCTOR DE LA VACUNA EN SUDAMERICA

En 1999 se inicia la búsqueda de un laboratorio que quisiera producir la vacuna en forma industrial, visitando laboratorios productores de productos veterinarios y médicos, de Argentina, Uruguay y Chile. La mayoría de los directores técnicos se interesaron en la vacuna experimental EG95, la primera vacuna contra un parásito que afecta a los animales y al hombre, pero solo Biogénesis y Rosenbuch de Argentina, manifiestan interés en producir la vacuna. También se visitaron los Ministerios de Salud y de Ganadería de Argentina.

En 2001, el laboratorio de productos veterinarios Biogénesis de Argentina firma un acuerdo de confidencialidad con el Laboratorio de Parasitología Molecular de la Universidad de Melbourne en Australia y el Centro de Investigación Animal de Nueva Zelandia, por los derechos de la vacuna. Años después desisten del proyecto, por considerarlo “no rentable”.

En 2008 el laboratorio Tecnovax SA de Argentina se interesa en la vacuna y firma un acuerdo comercial con la Ag Research de Nueva Zelandia y la Universidad de Melbourne de Australia, iniciando posteriormente los trámites ante el SENASA Argentina, para producir y comercializar la vacuna en toda América y Europa.

En 2009 el Centro de Virología Animal del ICT-Milstein, perteneciente al Consejo de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, CONICET de Argentina y bajo la dirección de los investigadores Jose La Torre y Verónica Poggio, inicia la transferencia de la tecnología desde la Universidad de Melbourne de Australia y del Ag Research de Nueva Zelandia, con el objetivo de desarrollar la vacuna recombinante EG95 en Argentina, asegurando su efectividad y su bioequivalencia con la vacuna experimental EG95, logrando una vacuna adaptada a las necesidades de la región sudamericana. Esta tarea fue realizada con el apoyo de la Agencia Nacional de Promoción Científica.

12 I LA PRODUCCION DE LA VACUNA A ESCALA INDUSTRIAL EN ARGENTINA

En enero de 2011 el Registro Nacional de Productos Veterinarios dependiente del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), aprueba el registro de la vacuna Providean Hidatil EG95® del laboratorio argentino Tecnovax.

Providean Hidatil EG95®, es la primera vacuna recombinante de uso veterinario contra la enfermedad hidatídica, con producción a escala industrial. Tecnovax SA es una compañía biofarmacéutica que desarrolla, produce y comercializa vacunas y productos biológicos para sanidad animal, fundada en el 2003.

Providean Hidatil EG95®, es una vacuna recombinante, proteica, altamente estable, segura y amigable con el medioambiente. Contiene 50 ug de proteína recombinante por dosis, emulsionada con 0,125 mg/dosis de saponina y con adyuvante oleoso Montanide ISA70. Es producida en células procariotas que expresan en su espacio intracelular la proteína EG95. El gen que codifica la proteína EG95 fue clonado a partir del material

genético presente en huevos de *E. granulosus* y expresado en bacterias *Escherichia coli*, las cuales fueron posteriormente inactivadas. La bacteria *Escherichia coli* transformada con un plásmido vector de expresion que porta los genes de la proteína glutatión S-transferasa del *Schisostoma japonicum* (GST) y EG95 bajo control del promotor inducible por isopropil tio-b-D-galactósido (IPTG,) produce grandes cantidades de la proteína de fusión EG95 de aproximadamente 40 kDa (el tamaño de EG95 sin GST es 16 kDa) en el citoplasma bacteriano como cuerpos de inclusión. La proteína recombinante EG95, es posteriormente solubilizada y purificada dando lugar al antígeno recombinante el cual se caracteriza por métodos bioquímicos, inmunológicos y moleculares para garantizar la calidad del producto obtenido.

La vacuna recombinante formulada con el antígeno purificado no es patogénica, no contiene microorganismos que pongan en peligro la seguridad del animal vacunado. No usa pesticidas, ni químicos. Es inocua y segura. Puede aplicarse a hembras preñadas. Puede aplicarse en animales con EQ, porque se puede distinguir mediante análisis serológicos animales vacunados de infectados. La vacuna protege a los hospederos intermediarios por al menos un año, previene que los parásitos lleguen a los perros y éstos diseminen los huevos, reduce la biomasa parasitaria en el medioambiente, interrumpe el ciclo de la enfermedad y evita que las personas contraigan la enfermedad.

En septiembre 2011 el laboratorio de productos bilógicos Tecnovax SA, junto a los Ministros de Ciencia, de Industria, de Agricultura y Ganadería, de la República Argentina, anuncian la puesta en el mercado de la vacuna recombinante denominada Providean Hidatil EG95®, **la primera vacuna efectiva contra un parásito, disponible para su utilización por los propietarios de ganado y los programas de control.**

13 I LOS ENSAYOS CON LA VACUNA EG95 PRODUCIDA EN ARGENTINA

Con la vacuna recombinante EG95 producida en el Centro de Virología Animal. CEVAN- ICT MILSTEIN-CONICET, de la ciudad de Buenos Aires, se realizó un ensayo en ovinos.

1.- Comparación de distintas formulaciones y adyuvantes en ovinos

Ensayo Argentina Nº 1. Chubut, estancia La Isla (2009–2015).

En mayo de 2.009, en la estancia “La Isla”, en Península Valdez (Chubut), se inicia un ensayo con el objetivo de monitorear la inmunidad conferida por la vacuna EG95 producida en Argentina y la vacuna experimental EG95 producida en Australia. Fue realizado en una región típica de la meseta patagónica sur, con escasas precipitaciones, inviernos fríos y veranos calurosos. Los animales cumplieron el ciclo reproductivo y productivo de la majada del establecimiento. Participaron cincuenta ovinos, divididos en cuatro grupos,

que recibieron 50µg de EG95 por dosis, con adyuvante acuoso Hidróxido de Aluminio, con adyuvante oleoso Montanide, ambas producidas en el CEVAN – CONICET de Argentina y con adyuvante saponina Quil A, producidas en la Universidad de Melbourne de Australia. Un grupo recibió un placebo. Los animales recibieron cuatro dosis de vacuna (V1, V2, V3 y V4) a los 01, 32, 455 y 1405 días. El ensayo duró 2.122 días, 69 meses o casi 6 años y para su evaluación fue dividido en dos etapas:

a.- Seguimiento serológico (2009-2013)

Al día 1405 del ensayo, a la edad de 55 meses de los ovinos, fueron evaluados los títulos de IgG anti-Eg95 inducidos en ovinos inmunizados con 2 y 3 dosis de distintas formulaciones del antígeno EG95. (Técnica ELISA). Sus resultados permitieron determinar que la inmunidad conferida por la vacuna EG95 producida en Argentina, con adyuvante oleoso Montanide ISA70, denominada Oleosa CEVAN, medidas en muestras de sangre a los 32, 57 y 455 días luego de aplicada dos dosis (V1 y V2) y a los 730 y 1405 días luego de aplicada un refuerzo anual (V3) fue equivalente a la vacuna experimental de Australia. La vacuna EG95 con adyuvante oleoso, fue superior a la formulación con adyuvante acuoso Hidróxido de Aluminio, denominada Acuosa CEVAN. Su horizonte de protección luego de aplicada la tercera dosis (V3) es superior a los dos años.

b.- Desafío y necropsia (2013-2015)

La segunda parte del ensayo se inicia al día 1405, con la aplicación de una cuarta dosis (V4) a 16 ovinos. El desafío fue realizado por vía oral a 40 ovinos, con aproximadamente 2.000 huevos de *E. granulosus s.l.*, obtenidos de perros naturalmente infestados, luego de 38 días de aplicada la cuarta dosis (V4) y luego de 989 días de aplicada la tercera dosis en 15 ovinos (V3). La necropsia para evaluar el número de quistes hidatídicos viables y no viables, fue realizada a los 32 ovinos que finalizaron el ensayo, en marzo del 2015. En los tratamientos con tres dosis (V3) y el desafío a los 33 meses (988 días), dando el máximo de chances al parásito, la formulación con adyuvante oleoso dio una protección del 85%, reduciendo el número de quistes viables, en comparación al control negativo. En los grupos de ovinos con cuatro dosis (V4) y el desafío al mes (38 días), dando el máximo de chances a la vacuna, se logró una alta protección con las tres formulaciones, en comparación al control negativo. Se logró una protección del 94% con la vacuna de Australia, del 95% con la oelosa de Cevan, y 88% con la vacuna acuosa de Cevan.

Conclusiones: Todas las formulaciones lograron reducir la biomasa de quistes disponibles con capacidad de infestar a los perros. La inmunidad a largo plazo luego de tres dosis (V1 y V2 como cordero) y un refuerzo (V3), con el desafío 33 meses después, con aproximadamente 2.000 huevos de *E. granulosus s.l.,* no protege plenamente. La vacuna producida en Argentina con adyuvante oleoso logró mejor protección que la vacuna con

adyuvante acuoso. La protección inducida por la vacuna oleosa producida en Argentina y la vacuna experimental producida en Australia, fueron equivalentes (Heath, 2012; Poggio, 2016).

Con vacuna recombinante EG95 de producción industrial, realizaron ensayos en ovinos (3), bovinos (1) y llamas (1), vacunados con Hidatil EG95 (50 μg Eg95, 0,125mg saponina, Montanide ISA 70 Seppic/dosis/mL) producida en Argentina, con vacuna recombinante experimental EG95 australiana (50 μg Eg95, 1 mg QuilA/dosis/mL) y un placebo (adyuvante oleoso). (Tabla Nº 3)

2.- Inmunidad en Ovinos

Ensayo Argentina Nº 2. Buenos Aires, Brandsen. (2011-2012)

Se inició en noviembre del 2011, en dos lotes de 14 y 29 corderas y ovejas de raza Merino, en Estación Gomez y Coronel Brandsen, en Provincia de Buenos Aires. Finalizo en noviembre de 2012. Los animales fueron separados en tres grupos: Control (n=15), vacunados con Vacuna Hidatil EG95 (50ug Eg95, 0,125mg saponina, Montanide ISA 70 Seppic/dosis/mL) producida en Argentina (n=20) y vacunados con vacuna recombinante experimental EG95 australiana (50ug Eg95, 1 mg QuilA/dosis/mL) (n=15). Los animales fueron inmunizados con 2 dosis de cada vacuna EG95 por vía subcutánea en la región inguinal y se tomaron muestras de sangre a los 0, 30, 60, 180 y 360 días post primo vacunación. El monitoreo de producción de anticuerpos IgG anti-EG95 en los animales vacunados y controles fue realizado mediante estudios serológicos seriados por técnica de ELISA. Luego de 2 dosis, los grupos vacunados ya sea con Providean Hidatil EG95 o vacuna australiana, mostraron títulos séricos que persistieron por 12 meses, mostrando un pico a los 60 dpv. No se observaron diferencia significativa entre los niveles de anticuerpos inducidos por las distintas formulaciones, ni en los títulos de anticuerpos detectados. Se asocia con un alto grado de protección que el grupo de ovinos vacunados, presentan una absorbancia de anticuerpos cercana o mayor a 0.8 (dil 1:200).

3.- Inmunidad en Llamas

Ensayo Argentina Nº 3. Jujuy, Abra Pampa (2011 – 2013)

Se inició en septiembre de 2011, en un lote de treinta llamas (*Lama glama*), en las instalaciones del INTA Abra Pampa, departamento Cochinoca, Provincia de Jujuy. Los departamentos Cochinoca y Yavi, de la Puna Argentina, concentran la mayor cantidad de llamas y ovinos de la Puna, todos pertenecientes a pequeños productores y la Hidatidosis es la principal zoonosis. Es el primer ensayo realizado en el mundo con la vacuna EG95 ya sea de origen industrial o experimental en camélidos sudamericanos domésticos. Tres grupos de Llamas menores de 8 meses, fueron vacunadas a días 0, 30 y 439

días con 3 dosis de la vacuna EG95 recombinante Hidatil EG95 (50ug Eg95, 0,125 mg saponina, Montanide ISA 70 Seppic/dosis/mL) producida en Argentina (n=10), con vacuna recombinante experimental EG95 producida en Australia (50ug Eg95, 1 mg QuilA/dosis/mL) (n=10). El grupo control (n=10) recibió solo placebo (adyuvante oleoso). La vacunación se realizó en la cara interna del muslo por vía subcutánea. En la primera dosis se utilizó la zona derecha y en la segunda dosis la izquierda, con jeringas individuales descartables tipo insulina. Los cambios en la temperatura corporal, el comportamiento y reacciones en el sitio de inyección fueron observados y registrados, por los veterinarios del INTA. No se registró aumento de temperatura, ni alteraciones del comportamiento ni reacciones comparando el grupo control de animales con el grupo vacunado de la misma edad.

Se tomaron muestras de sangre a los 0, 30, 60, 180, 439 y 764 días post primo vacunación. El estudio consideró la imunogenicidad inducida por la vacuna Hidatil EG95 y su comparación con la vacuna experimental australiana. Las diferencias entre los niveles de anticuerpos séricos inducidos por la vacuna industrial EG95 presentan diferencias no significativas (>0,05) comparados con la formulación experimental. Luego del refuerzo, los títulos séricos aumentan y son de similar magnitud (439 dpv) a los observados al día 30 (con una dosis) en los animales vacunados con ambas formulaciones y a 764 dpv son aún mayores que los observados al día 30 con 1 dosis y similares a los observados a los 180 días respectivamente. Se observa que los animales vacunados con la formulación EG95 argentina indujeron niveles y títulos de anticuerpos significativos y mayores a los obtenidos en el grupo control y similares a los de la vacuna australiana. (Poggio, 2016)

Ensayo	Provincia	Año	Especie	Número animales	Número dosis	Via aplicación
2	Buenos Aires	2011	Ovinos	50	1	SC
3	Jujuy	2011	Llamas	30	3	SC
4	Buenos Aires	2013	Bovinos	65	2	SC
5	Chubut	2013	Ovinos	30	2	SC
6	Chubut	2013	Ovinos	30	2	SC

Tabla 3. Ensayos con vacuna de producción industrial en ovinos, bovinos y llamas.

4.- Inmunidad en Bovinos

Ensayo Argentina Nº 4. Buenos Aires, C. de Areco, (2013 – 2014)

Se inició en abril de 2013, en un lote de 65 bovinos de raza Hereford, en la localidad de Rawson, Carmen de Areco, Ruta 51, km 146, Provincia de Buenos Aires, con el objetivo de determinar la dosis efectiva y segura de la vacuna EG95, en bovinos.

Se separaron del rodeo, sesenta y cinco (n=65) bovinos (*Bos taurus*) menores de 6 meses de raza Hereford, con aproximadamente tres meses de edad y se identificaron con caravana. Los animales siguieron el plan de manejo y sanitario del establecimiento donde se realizó el ensayo. Se formaron 7 grupos de 5 animales, tomados al azar, los cuales fueron inmunizados a 0 y 30 días, con distintas formulaciones: con 100ug, 150ug, 200ug, y 300ug de EG95, con 1,4 y 2,1 ml de Montanide ISA70 y con 0.250mg y 0.375mg de saponina. La vacuna se administró por vía subcutánea en el tercio medio superior de la tabla del cuello. La primera dosis de la derecha y la segunda en la izquierda, con jeringas individuales descartables. Cambios en el comportamiento, temperatura corporal y reacciones en el sitio de inoculación, fueron observados y recopilados, a las 2, 6, 24, 48, 72 hs y a día 4, 5, 6 y 7 días de colocada la primera y segunda dosis de la vacuna. Se tomaron muestras séricas en los días 0, 30, 60 y 180 días y se determinó el nivel de anticuerpos séricos anti EG95 en cada grupo de animales: vacunados y testigos a los diferentes tiempos por técnica de ELISA.

Conclusión: Por los estudios de seguridad y evaluación dosis–respuesta, la formulación con 100ug de EG95 y adyuvante oleoso con 0.250mg saponina y 1,4 ml de Montanide ISA70, en un volumen de 2 ml, resultó ser la más segura y eficaz, para la aplicación en bovinos.

5.- Edad de aplicación de la primera dosis en ovinos

Ensayo Argentina Nº 5. Chubut, Sarmiento (2012–2013)

Los rumiantes se caracterizan por su capacidad para alimentarse de pasto. El cordero nace con su aparato digestivo adaptado a una dieta láctea, propia de un no-rumiante. Paulatinamente van transformando su alimentación, al comenzar a ingerir pasto alrededor de las tres semanas de vida, para ser rumiante adulto a las ocho semanas. Al momento de ingerir pasto, comienza su riesgo de ingerir huevos de *E granulosus*, debiendo estar protegido por los anticuerpos calostrales o anticuerpos inducidos por la vacuna.

Con el propósito de testear la seguridad y eficacia de la vacuna administrada en ovinos a partir de las cuatro semanas de vida, se formarán 3 grupos de 10 corderos de raza Merino, tomados al azar del corral, identificados con doble caravana, con aproximadamente 4 semanas de edad, pertenecientes al Centro de Investigación en Zoonosis en Sarmiento, Chubut. A cada grupo se les administró la vacuna Providean Hidatil EG95®, la vacuna recombinante australiana EG95-GST y un placebo sin antígeno proteico EG95 respectivamente. Se midió la inmunidad conferida en muestras de sangre tomadas a los 0, 30 y 60 días post vacunación, mediante un ELISA para detección de anticuerpos séricos anti-EG95. Los niveles de anticuerpos detectados fueron equivalentes para las dos formulaciones y similares a los obtenidos en los ensayos con aplicación de las vacunas a partir de los tres meses. No se observaron cambios en la temperatura corporal,

el comportamiento y reacciones en el sitio de inyección, en lo días posteriores a las dos vacunaciones.

6.- Inmunidad calostral en Ovinos

Ensayo Argentina Nº 6. Chubut (2012 – 2013)

Con el objetivo de detectar la presencia, en función de la edad, de los anticuerpos (Ac) anti-EG95 transferidos por el calostro, en corderos nacidos de madres vacunadas con Providean Hidatil EG95® y determinar el momento ideal para la aplicación de la primera dosis de vacuna, ovejas Merino destinadas a vientre del Centro de Investigación en Zoonosis en Sarmiento, Chubut, fueron divididas en dos grupos: M1: una única dosis de vacuna 45 días antes de la fecha de parición; y M2: primera dosis 30 días antes de la fecha de servicio, y la segunda dosis 45 días antes de la fecha de parición. Después del parto, y durante 28 días, se extrajo suero y calostro/leche en cada grupo. Se definieron dos poblaciones de corderos recién nacidos: C1 y C2 según fueran hijos de M1 o M2. Inmediatamente después del nacimiento, y durante 90 días, se extrajeron muestras de suero. Se determinaron los títulos de anticuerpos anti-EG95 para cada muestra de cada grupo de madres (suero/calostro) y corderos (suero) en diferentes tiempos. Se observó que en todos los animales expuestos a dos dosis de vacunación los títulos séricos de Ac IgG anti EG95 fueron significativamente mayores a los expuestos a una única dosis. En el suero de los corderos el pico máximo de Acs se detectó a las 24 hs posteriores al parto, manteniéndose en niveles protectivos altos hasta los 28 días y con niveles protectivos hasta el día 75. Los resultados indican que los Acs IgG anti-EG95 se concentran significativamente en el calostro de las ovejas previo al parto originándose la transferencia efectiva de los anticuerpos al cordero. Teniendo en cuenta la persistencia en suero de los Ac vacunales adquiridos por los corderos en forma pasiva, sería ideal iniciar la vacunación a partir de la cuarta semana de vida de los corderos hijos de madres vacunadas.

14 I MONITOREO DE LA INMUNIDAD ALCANZADA POR LA VACUNA

La potencia y eficacia de la vacuna se determina a través del desafío de los animales vacunados con huevos de *E. granulosus* y su posterior necropsia para determinar la reducción en el desarrollo y número de quistes hidatídicos viables con respecto a los animales no vacunados. Este ensayo es el “gold estándar” para evaluar el grado de protección del inmunógeno. Es una prueba que lleva aproximadamente 18 meses, desde la vacunación de los animales, el desafío (infestación) con *E. granulosus* hasta el desarrollo de los quistes, con la desventaja de mantener animales infestados y sacrificarlos al final del ensayo.

a.- Monitoreo de la producción de anticuerpos anti EG95

Por estudios serológicos podemos medir el nivel de anticuerpos vacunales producidos por la vacuna y también estimar la cobertura lograda por los vacunadores, en la aplicación de la vacuna. El monitoreo de producción de anticuerpos IgG anti-EG95 en los animales vacunados y controles es realizado mediante estudios serológicos seriados por técnica de ELISA.

Procedimientos ELISA: Se sensibiliza una placa de ELISA con antígeno EG95 (similar al utilizado en la formulación de la vacuna). Los sueros se diluyen y se incuban en esta placa para que se produzca la reacción Ag-Ac. Después de varios lavados se agrega una Ig anti ovino marcada con una enzima peroxidasa. Esta va a acoplarse en las muestras en que se produjo la reacción Ac-Ac. La enzima se enfrenta con un sustrato productor de color, este color se mide con un lector de placas. La intensidad del color (DO) es directamente proporcional a la concentración de Ac de la muestra. Se grafican los valores de DO para cada uno de los muestreos y así visualizar el nivel de los mismos a media que transcurre el tiempo.

b.- Test de la oncósfera

Debido a que la protección inducida por la vacuna esta medida por anticuerpos específicos anti-EG95 a través de su unión al complemento y éstos tienen la capacidad de lisar oncósferas activadas “in vitro”, el diseño, desarrollo y estandarización del “Test de la Oncósfera” permitirá evaluar el grado de protección inducido por los Ac específicos, evitando la infestación con huevos de *E. granulosus* y la necropsia de animales involucrados en los ensayos.

15 I ESQUEMA Y DURACION DEL PROGRAMA DE VACUNACION

Para determinar el esquema y las fechas de vacunación, a utilizar en cada establecimiento o región bajo programa, debemos tener en cuenta el riesgo de contraer EQ, el ganado a vacunar, el tipo de manejo del ganado, las condiciones climáticas y los calendarios sanitarios y de manejo.

El esquema “ideal”

Al inicio del programa, vacunar a todos los animales susceptibles dos veces, con aproximadamente un mes de diferencia, incluyendo los animales jóvenes en el momento del destete. En el segundo año y posteriores, vacunar a todos los animales recién nacidos dos veces, aproximadamente con un mes de diferencia. Una sola vacunación de refuerzo a todos los animales vacunados previamente. Si se ingresan animales al establecimiento, vacunar con dos dosis, con un mes de diferencia. (Marshall Lightowlers, Seminario de Hidatidosis, Santiago de Chile, 2016)

En rumiantes menores en Patagonia Sur

En el inicio del esquema de vacunación aplicar dos dosis a todos los animales. La primera en los trabajos previos a la parición y la segunda en la esquila. Los corderos y chivitos recibirán la primera dosis en la señalada. Durante los trabajos de esquila de los adultos, se aplica la segunda dosis a los corderos y chivitos y se completa el esquema en el resto de los rumiantes menores. En zonas de alto riesgo aplicar un refuerzo anual a todos los rumiantes en los trabajos previos a la parición; con el objetivo de fortalecer la inmunidad calostral y proteger a los rumiantes menores que pastan en los potreros cercanos a los cascos y/o puestos, que generalmente son los animales de mayor valor, como los reproductores y animales de consumo. En zonas de bajo riesgo aplicar un refuerzo anual a las madres en los trabajos previos a la parición. En las chacras, granjas y pequeños establecimientos, donde se practica él encierre nocturno y/o que los rumiantes menores pastan cerca de la vivienda del productor y sus perros, los animales deberían mantener un nivel de anticuerpos protectivos y los corderos y chivitos recibir la primera dosis a las 4 semanas de nacidos. En los sistemas de veranada-invernada los rumiantes menores deberán iniciar los arreos hacia las veranadas, con un nivel alto de anticuerpos; con la segunda dosis y/o el refuerzo anual aplicado.

En rumiantes menores y mayores en zonas endémicas

En el inicio del programa de control utilizando la vacuna, a partir del mes de vida aplicar la primera dosis de vacuna a corderos, chivos y terneros. Al menos treinta días después, aplicar la segunda dosis. A los animales adultos aplicar una dosis. En los años posteriores, a partir del mes de vida aplicar la primera dosis a corderos, chivitos y terneros y al menos treinta días después aplicar la segunda dosis. Aplicar un refuerzo anual a todos los animales. A las madres para asegurar la transferencia de inmunidad calostral y a los machos castrados, porque desde este grupo sale la mayoría de los animales destinados a la faena familiar.

La duración del programa de vacunación

Como la vacuna no afecta a los quistes hidatídicos establecidos en los animales, el esquema de vacunación se debe mantener durante los años necesarios para la reposición de todo el ganado del establecimiento. Esta reposición es diferente según el tipo de ganado, el sistema productivo y el manejo de los animales. Influyen las ventas y compras de animales, el estado de los pastizales y las condiciones climáticas, que son distintas año a año, para cada región.

16 I LA VACUNA RECOMBINANTE DE PRODUCCCION INDUSTRIAL EN LOS PROGRAMA DE CONTROL

En el año 2016, a 90 años de que el médico e hidatidólogo francés Félix Agustin Dévé, publicará su primer trabajo, el producto de muchos técnicos e investigadores, y de la industria farmacéutica veterinaria, se comenzó a aplicar dentro de las actividades planificadas por los programas de control de Hidatidosis, con el objetivo de evitar que los niños se enfermen de EQ.

a.- El mayo de 2016, en el predio Miraflores, ubicado en el sector de Cerro Galera Chico, cercano a la localidad de Balmaceda, en la provincia de Coyhaique, de la XI Región Aisén de la República de Chile, se aplicó a una oveja adulta de raza Texel, la vacuna recombinante EG95 de distribución industrial. De esta forma la división Protección Pecuaria Regional, del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) de la Región de Aysén dió inicio al programa de control de la Hidatidosis, coordinado por el Veterinario Tomas Chacon, que incluye 4.000 ovinos, en 30 rebaños, distribuidos en Galera Chico, en la localidad de Balmaceda y El Maitén, en la comuna de Cochrane, XI Región Aisén, Chile, utilizando la vacuna Providean Hidatil EG95®, como medida de control.

b.- En noviembre de 2016, en el Alto Bio Bio, VIII Región de la República del Chile, zona de pequeños productores, la mayoría Pehuenches, con casos de Hidatidosis en chicos, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), incluyó la vacunación como herramienta de control, en el programa de control de la hidatidosis, donde el Seremí Salud realiza atención en las personas y desparasita los perros y los municipios realizarán control de la población canina. El programa de vacunación incluye 15.000 ovinos y 1400 productores y es dirigido por el veterinario Guido Merino Rubilar del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). Se aplicaron 29.000 dosis de vacunas entre los meses de septiembre y mayo 2016, 17, 18 y 19. con coberturas superiores al 90%.

c.- En julio de 2017, en la Isla del Rey, región de Los Ríos, en Chile, fueron inmunizados contra la Hidatidosis, ovejas de pequeños agricultores. La Universidad Austral de Chile busca eliminar EQ en Isla del Rey, con un programa de control de hidatidosis, dirigido por el Profesor Rafael Tamayo, que incluye desparasitación de los perros, educación de la población y vacunación de los ovinos.

17 I CONTROL DE HIDATIDOSIS CON LA VACUNA RECOMBINANTE EG95

La incorporación de acciones directas de control en los ovinos, bovinos, llamas y caprinos, que prevengan la infección y disminuyan la oferta de quistes hidatídicos para los perros, abre nuevas perspectivas a los programas de control, al posibilitar atacar al ciclo de la enfermedad hidatídica en un nuevo frente, lo que va a permitir lograr un control sostenido de la enfermedad en el tiempo. De las medidas existentes para prevenir enfermedades infecciosas**, la vacunación es sin duda la más útil.**

La vacuna contra EQ aplicada en los hospederos intermediarios, permitirá a los programas de control de la EQ **disminuir** el tiempo en controlar la enfermedad en su territorio, al poder atacar el ciclo de la enfermedad en un nuevo frente, esto a su vez permitirá reducir la oferta de quistes hidatídicos disponibles para los hospederos definitivos y por ende disminuir la biomasa parasitaria disponible para los hospederos intermediarios, ayudando así a **reducir el riesgo de enfermar de las personas.**

La vacuna contra EQ aplicada en el ganado permitirá a los productores agropecuarios contar con una nueva herramienta para **controlar la enfermedad** en su establecimiento o campo, que deberá sumar, a las hoy disponibles, como el control de la faena, la desparasitación periódica de los perros y la educación sanitaria.

REFERENCIAS

Dévé, F. 1927.- ***Essai de Vaccination Anti chinococcique par de Sable Hydatique Tyndalise***. Compt. rend. Soc. de biol.*, 97: 1130-1131*

Gemmell MA. **Immunological responses of the mammalian host against tape-worm infections** IV. *Especificidad de especie de embrión hexacanto en la protección de ovejas contra Echinococcus granulosus*. Inmunología. 1966; 11:. 325-33

Gemmell MA , Soulsby EJ. ***The development of acquired immunity to tapeworms and progress towards active immunization, with special reference to Echinococcus spp***. . Bull World Health Organ 1968; 39 (1): 45-55.

Heath DD, Parmeter SN, Osborn PJ, Lawrence SB. ***Resistance* to *Echinococcus granulosus infection in lambs. J Parasito***l. 1981 Dec;67(6):797-99.

Heath DD, Lawrence SB. ***Antigenic polypeptides of Echinococcus granulosus oncospheres and definition of protective molecules***. Parasite Immunol. 1996 Jul;18(7):347-57.

Heath DD, Koolaard J. ***Serological monitoring of protection of sheep against Echinococcus granulosus induced by the EG95 vaccine***. Parasite Immunol. 2012 Jan;34(1):40-4. doi: 10.1111/j.1365-3024.2011.01341.x.

Heath DD, Jensen O, Lightowlers MV. ***Progress in control of hydatidosis using – a review of formulation and delivery of the vaccine and recommendations for practical use in control programmes.*** Acta Tropica. 2003; 85 133-143

Jensen O, Fernández E. ***Inmunización en el hospedador intermediario. Desarrollo de la vacuna recombinante EG95***. En: *Situación de la Hidatidosis-Echinococcosis en la República Argentina*, Denegri GM, Elissondo MC, Dopchiz MC (Ed) Editorial Martín, Mar del Plata 2002; pp 51-55

Jensen O, Sanchez P y Ligtowleres M. ***La vacuna EG95, diez años después.*** En Temas de Zoonosis III, Editor Asociación Argentina de Zoonosis Buenos Aires 2006. 35-42

Larrieu E, Herrero E, Mujica G, Labanchi JL, Araya D, Grizmado C, Calabro A, Talmon G, Ruesta G, Perez A, Gatti A, Santillán G, Cabrera M, Arezzo M, Seleiman M, Cavagión L, Cachau MG, Alvarez Rojas CA, Gino L, Gauci CG, Heath DD, Lamberti R, Lightowlers MW. ***Pilot field trial of the EG95 vaccine against ovine cystic*** *echinococcosis in Rio Negro, Argentina: early impact and preliminary data.* Acta Trop. 2013 Aug;127(2):143-51.

Larrieu E, Mujica G, Gauci CG, Vizcaychipi K, Seleiman M, Herrero E, Labanchi JL, Araya D, Sepúlveda L, Grizmado C, Calabro A, Talmon G, Poggio TV, Crowley P, Cespedes G, Santillán G, García Cachau M, Lamberti R, Gino L, Donadeu M, Lightowlers MW **Pilot Field Trial of the EG95** ***Vaccine Against Ovine Cystic Echinococcosis in Rio Negro, Argentina: Second Study of Impact****.* PLoS Negl Trop Dis. 2015 Oct 30;9(10): e0004134. doi: 10.1371/journal.pntd.0004134. Collection *2015.*

Lightowlers MW. **Infecciones por *Echinococcus*: *Aspectos inmunobiológicos y de vacunación***. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. 1994; 1-21.

Lightowlers MW, Colebrook A.L., Gauci C.G., Gauci S.M., Kyngdon C.T., Monkhouse J.L., Vallejo Rodriquez C., Read A.J., Rolfe R.A., Sato C. ***Vaccination against cestode parasites: anti-helminth vaccines that work and why****.* Veterinary Parasitology 115 (2003) 83–123

Lightowlers MW, Lawrence SB, Gauci CG, Young J, Ralston MJ, Maas D, Health DD. ***Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen. Parasite Immunol***. 1996 Sep;18(9):457-62.

Lightowlers MW, Jensen O, Fernández E, Iriarte JA, Woollard DJ, Gauci CG, Jenkins DJ, Heath DD. ***Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the EG95 hydatid vaccine in sheep*****. Internacional Journal for Parasitology**. 1999; 29: 531-534

Lightowlers MW, Flisser A, Gauci CG, Heath DD, Jensen O, Rolfe R. ***Vaccination Against Cisticercosis and Hydatid Disease***. Parasitology Today. 2000; 179: 191-196

Osborn PJ, Heath DD ***Immunisation of lambs against Echinococcus granulosus using antigens obtained by incubation of oncospheres in vitro***. Res Vet Sci. 1982 Jul;33 (1):132-3.

Poggio TV, Jensen O, Mossello M, Iriarte J, Avila HG, Gertiser ML, Serafino JJ, Romero S, Echenique MA, Dominguez E, Barrios, Heath D. ***Serology and longevity of immunity against echinococcus granulosus in sheep and llama induced by an oil based eg95 vaccine****.* Parasite Immunol. 2016 Apr 22. doi: 10.1111/pim.12325.

Turner EL, Dennis EW y Berberian DA. ***The production of artificial immunity against hydatid disease in sheep****.* The Journal of Parasitology, 1937, Vol. 23, No. 1 ., pp. 43-61

Vivallo Cuevas, Iris Olivia. Tesis doctoral*:* ***Evaluación de la vacuna Eg95 contra hidatidosis en ovinos.*** Facultad de Veterinaria, Universidad de Concepción, Chile, 2004.-

CAPÍTULO 9

DISPONIBILIDADE DE INFORMAÇÃO ORNITOLÓGICA DAS UNIDADES DE CONSERVAÇÃO DO ESTADO DO PARANÁ: PLANOS DE MANEJO

Data de aceite: 26/05/2021
Data de submissão: 06/03/2021

Adriana Barbosa Bussler
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR
Santa Helena – Paraná
https://orcid.org/0000-0002-4528-0531

Vagner Cavarzere
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais e Sustentabilidade
Santa Helena, Paraná
http://orcid.org/0000-0003-0510-4557

RESUMO: Mais de 2 milhões hectaresdo Paranárepresentam áreas preservadas por Unidades de Conservação (UC), o que equivale a cerca de 15% da área do estado. No entanto, a compilação do conhecimento sobre quantas destas UC disponibilizam suas informações por meio de seus planos de manejo é inexistente. Devido ao fato de as aves representarem o grupo de maior facilidade de registro e que gera importante informação acerca da qualidade ambiental, a riqueza de espécies deste táxon frequentemente consta em tais documentos. Desse modo, foi feito levantamento de todos os planos de manejo das UC paranaenses (níveis federal, estadual e municipal), bem como de seus registros ornitológicos,para determinar a disponibilidade de acesso a estas informações. O Paraná possui 360 UC distribuídas em 11 sub-categorias. UC de Proteção Integral estão distribuídas em 60 municípios, enquanto as de Uso Sustentável, em 140; no total há 189 (47%) municípios com presença de UC. Dos 71 planos de manejo disponíveis(20% de todas as UC), 40 (56%) trazem informações sobre aves. As UC de Proteção Integral (n = 22) possuem 162,7 ± 129,0 espécies, enquanto as de Uso Sustentável (n = 18), 136,6 ± 109,9. Entre as UC de Proteção Integral, as Estações Ecológicas são as que possuem mais espécies. Sugerimos que as UC paranaenses disponibilizem todos os dados existentes para consulta, bem como novos estudos sobre conhecimento básico devam ser instigados dentro de seus territórios.
PALAVRAS-CHAVE: Avifauna. Acesso de dados. Lacunas de conhecimento.

ORNITHOLOGICAL DATA AVAILABILITY FROM PROTECTED AREAS WITHIN PARANÁ STATE: MANAGEMENT PLANS

ABSTRACT: More than 2 million hectares in Paraná, southern Brazil, represent protected areas (UC), equivalent to some 15% of the state's area. However, the compilation of knowledge on how many of these UC have their data available through their management plans does not exist. Due to the fact that birds represent a readily recorded group of animals and that they are good environmental indicators, lists ofspecies of this taxon are frequently included in such documents. Thus, we reviewed all management plans of Paraná's (federal, state and municipal levels) protected areas, as well as their ornithological records, to determine the availability of access

to this information. Paraná has 360 UC distributed in 11 categories. Integral protection UC are distributed in 60 municipalities, while those of sustainable use, by 140; overall there are 189 (47%) municipalities with UC. Of the 71 management plans available(20% of all UC), 40 (56%) provide information about birds. Integral protection UC (n = 22) have 162.7 ± 129.0 species, while those for sustainable use (n = 18) have 136.6 ± 109.9. Among the integral protection UC, ecological stations show more species. We suggest Paraná's UC should provide all available data for consultation, as well as new studies on basic knowledge be instigated within their territories.
KEYWORDS: Avifauna. Data access. Knowledge gap.

1 I INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica possuía originalmente mais de 150 milhões de hectares (ha). Sua fragmentação atual é alarmante, pois se estima que restem 28% de sua cobertura florestal(REZENDE et al., 2018),sendo a maioria dos remanescentes pequenos (< 50 ha) e distantes uns dos outros (RIBEIRO et al., 2009). No entanto, este domínio fitogeográfico ainda detém os maiores índices de endemismo e ameaça do planeta;das 1.025 espécies de aves que nele ocorrem, 215 são consideradas endêmicas, e mais da metade delas está enquadrada sob algum grau de ameaça em níveis estadual, nacional e global (PARANÁ, 2018; IUCN, 2019; FIGUEIREDO et al., 2021).

No estado do Paraná, onde a maior parte da cobertura florestal foi eliminada a partir da década de 1960, restam apenas paisagens fragmentadas, com perda significativa da vegetação original, passando de 84% para 9% de seu território (MAACK, 2017; SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2019).Neste contexto, as áreas protegidas por lei tornam-se de fundamental importância para a manutenção da biodiversidade. Para potencializar o papel das Unidades de Conservação (UC), de modo que sejam planejadas e administradas de forma integrada com as demais UC em nível nacional, foi concebido o Sistema Nacional de Unidades de Conservação (SNUC). O SNUC é o conjunto de UC federais, estaduais e municipais composto por 12 categorias.Seus objetivos específicos diferenciam quanto à forma de proteção e usos permitidos: aquelas que demandam de maiores cuidados devido à sua fragilidade e particularidades,e aquelas cujautilização sustentável é permitida, mantendo suaconservação(BRASIL, 2000).

As UC categorizam-se em dois grupos: Unidades de Proteção Integral, que objetivaproteger a natureza e, portanto, possui regras e normas restritivas, e Unidades de Uso Sustentável, áreas que visam conciliar a preservação da natureza com o uso sustentável dos recursos naturais. No primeiro grupo é permitido apenas o uso indireto de recursos naturais semque haja consumo, coleta ou danos. As subcategorias de Proteção Integral são: Estação Ecológica, Reserva Biológica, Parque, Monumento Natural e Refúgio de Vida Silvestre. No segundo grupo, coleta e uso de recursos naturais são permitidas, desde que praticadas de forma a asseguraro uso contínuo e futuro dos recursos ambientais

renováveis e dos processos ecológicos. As subcategorias de Uso Sustentável são: Área de Relevante Interesse Ecológico, Floresta Nacional, Reserva de Fauna, Reserva de Desenvolvimento Sustentável, Reserva Extrativista, Área de Proteção Ambiental e Reserva Particular do Patrimônio Natural (MMA, 2020).

Mais de 2.800.000 ha do Paraná (14% da área total) representam áreas preservadas por UC estaduais e federais(IAT, 2020), sendo 2% por UC de Proteção Integral (VICENTE; VANZELA; TOREZAN, 2009). Iniciativas privadas de proteção ao ambiente, as chamadas Reservas Particulares do Patrimônio Natural perfazem aproximadamente 50.000 ha de matas igualmente preservadas(IAT, 2020).A análise de mapas de vegetação original e remanescente de UC estaduais e federais e de áreas prioritárias para conservaçãodemonstraram que as diferentes formações vegetacionais não estão adequadamente representadas no Sistema Estadual de Unidades de Conservação do Paraná(VICENTE; VANZELA; TOREZAN, 2009). Enquanto as formações associadas à Floresta Ombrófila Densa possuem elevada representação (13%), outras possuem pouca, com exceção da Várzea Estacional. A Floresta Ombrófila Mista tem apenas 0,4% de sua área de ocorrência natural protegida, a Floresta Estacional Semidecidual, 3,3%, o Cerrado 0,8% e a Estepe Gramíneo-lenhosa possui 0,4%. Desse modo, as UC paranaenses englobam desproporcional representação das formações vegetacionais, especialmente as mais ameaçadas, que possuem alta percentagem de áreas prioritárias, poucas áreas protegidas ou remanescentes, tais como o Cerrado, a Estepe, e as Florestas Ombrófilas Mistas e Estacionais Semideciduais(VICENTE; VANZELA; TOREZAN, 2009).

Planos de manejo frequentemente utilizam os resultados gerados a partir de observações de aves para caracterização de fauna. As aves constituem grupo facilmente observado graças à sua inerência por hábitos diurnos e conspícuos, bem como pela adequabilidade logística, uma vez que não necessárias armadilhas para o registro das espécies, as quais podem ser seguramente identificadas por meio de visualização e, especialmente, de suas vocalizações. Dentro deste contexto, pretendeu-se fazer o levantamento de todos os planos de manejo, e de seus registros ornitológicos, disponíveis das UC paranaenses(em âmbito federal, estadual e municipal) para se determinara disponibilidade de acesso a estas informações.

2 I MATERIAL E MÉTODOS

As informações sobre as espécies de aves foram obtidas a partir dos planos de manejo das UC paranaenses, desde que disponíveis. Tais documentos, em âmbito municipal e estadual, foram baixadosdo site do Instituto Água e Terra (http://www.iat.pr.gov.br). No caso de Reservas Particulares do Patrimônio Natural também foi necessário contato direto com a Confederação Nacional de Reservas Particulares do Patrimônio Natural (CNRPPN;https://www.rppn.org.br) e a Coordenação PSA/RPPN do IAT. As informações

de UC federais foram provenientes do site do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade(ICMBio;https://www.icmbio.gov.br/portal/planosmanejo).

A taxonomia e a nomenclatura das espécies de aves seguem PIACENTINI et al.(2015), e as espécies ameaçadas no Paraná estão de acordo com sua última atualização (PARANÁ, 2018). Espécies endêmicas da Mata Atlântica são aquelas assim consideradas por VALE et al.(2018).

2.1 Análises

Após averiguação de ausência de normalidade para os valores de riqueza, foram utilizados testes não-paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal-Wallispara comparações entre medianas de riquezas entre categorias e classificações de UC paranaenses, respectivamente.

3 I RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Paraná possui 360 UCdistribuídas em 11subcategorias, sendo sete de Proteção Integral e quatro de Uso Sustentável. Dentre a primeira categoria, háoitoEstações Ecológicas, três Monumentos Naturais, cinco Parques Nacionais, 34Parques Estaduais, um ParqueFlorestal Estadual, duasReservas Biológica e doisRefúgio da Vida Silvestre. DasUC de Uso Sustentávelhá 25Áreas de Proteção Ambiental, cinco Áreas de Relevante Interesse Ecológico, duas Florestas Nacionais e 273Reservas Particulares do Patrimônio Natural(Tabela 1).

Categoria	Classificação*	Contagem UC	Área (ha)
Proteção Integral	ESEC	8	20.267,8
	MN	3	422,9
	PARNA	5	340.852,5
	PE	34	82.269,0
	PFE	1	48,7
	REBIO	2	133,1
	RVS	2	196,8**
Subtotal		55	452.906,8
Uso Sustentável	APA	25	2.532.243,9
	ARIE	5	1.867,1
	FLONA	2	4.223,8
	RPPN	273	61.116,4

Subtotal		305	2.599.451,2
TOTAL		359	3.052.357,9

* ESEC = Estação Ecológica, MN = Monumento Natural, PARNA = Parque Nacional, PE = Parque Estadual, PFE = Parque Florestal Estadual, REBIO = Reserva Biológica,RVS = Refúgio da Vida Silvestre. APA = Área de Proteção Ambiental, ARIE = Área de Relevante Interesse Ecológico, FLONA = Floresta Nacional eRPPN = Reserva Particular do Patrimônio Natural.

** Área indisponível para RVS de Jacarezinho.

Tabela 1. Quantidade de Unidades de Conservação paranaenses distribuídas em suas 11 classificações dentro das categorias propostas pelo Sistema Nacional de Unidades de Conservação.

UC de Proteção Integral estão distribuídas em 60 municípios e compreendem área de 452.906,8ha (15%), enquanto as de Uso Sustentável distribuem-se por 140 territórios municipais que incluem 2.599.317,1 ha (86%). No total há 189(47%) municípios com presença de UC, as quais somam 3.052.357,9ha, ou 15% do território paranaense (Figura 1).Do total das UC acima mencionadas, até 18 de julho de 2020, dos 71(20% de todas as UC) planos de manejo disponíveis, 40 (56%) trazem informações sobre sua avifauna (Tabela 2). Tais planos de manejo resgatam 675 espécies de aves, ou 90% de todas as espécies do estado do Paraná (SCHERER-NETOet al., 2011), sendo 141 endêmicas da Mata Atlântica e 88 ameaçadas no estado (PARANÁ, 2018). As espécies mais mencionadas em planos de manejo foram: o joão-de-barro *Furnariusrufus* (Gmelin, 1788) (menção em 32 planos de manejo), a rolinha-roxa *Columbina talpacoti* (Temminck, 1810) (n=31), o bem-te-vi *Pitangussulphuratus* (Linnaeus, 1766) (n=31), o quero-quero *Vanelluschilensis* (Molina, 1782) (n=31) eo carcará *Caracaraplancus* (Miller, 1777) (n=30).

Categoria	Classifi-cação	Nome	Rique-za/UC	Endê-micas	Amea-çadas	Roque-za Total	Endê-micas Total	DD	Amea-çadas Total
Proteção Integral	ESEC	do Caiuá	357	30	28	519	95	8	50
		do Guaraguaçu	334	85	24				
		do Rio dos Touros	36	11	1				
		Ilha do Mel	253	39	8				
	PARNA	de Ilha Grande	206	15	28	198	16	6	28
		do Iguaçu	2	2	2				
	PE	da Cabeça do Cachorro	69	11	4	527	128	5	55
		de Ibicatu	11	0	0				
		de Ibiporã	9	1	1				
		de Palmas	5	2	0				
		de São Camilo	43	4	1				
		de Vila Rica do Espírito Santo	261	48	3				
		de Vila Velha	235	33	9				
		do Cerrado	289	38	20				
		do Guartelá	189	35	3				
		do Lago Azul	229	42	2				
		do Marumbi	34	13	2				
		do Monge	97	15	1				
		do Rio da Onça	27	9	1				
		do Rio Guarani	254	58	9				
		Mata dos Godoy	282	59	11				
		Serra da Baitaca	358	108	29				

Uso Sustentável	APA	de Guaraqueçaba	5	3	5	353	71	3	28
		Estadual da Escarpa Devoniana	35	8	18				
		Estadual da Serra da Esperança	330	70	15				
	FLONA	de Irati	82	39	16	82	39	2	16
	RPPN	Barra Mansa	266	56	1	509	118	4	42
		Fazenda Paiquerê	28	4	1				
		Fazenda Santa Fé	175	2	1				
		Fazenda Santa Francisca	140	9	4				
		Fazenda Santa Olímpia	124	16	0				
		Fazenda São Bento	71	4	0				
		Invernada Barreiro	28	4	1				
		Luz do Sol	110	10	0				
		Monte Sinai	125	26	0				
		Perna do Pirata	198	59	4				
		Rancho Sonho Meu	377	83	22				
		Reserva Natural Serra do Itaqui	244	68	19				
		Sítio Serra do Tigre	7	0	0				
		Vilar	115	30	0				
TOTAL						676	141	18	88

Tabela 2. Lista das 40 unidades de conservação (UC) que possuem informações sobre suas avifaunas em seus respectivos planos de manejo. São indicadas riqueza, número de espécies endêmicas da Mata Atlântica (Vale et al., 2018), número de espécies ameaçadas no estado do Paraná para cada UC, bem como número de espécies consideradas deficientes de dados (DD) no estado (PARANÁ, 2018).

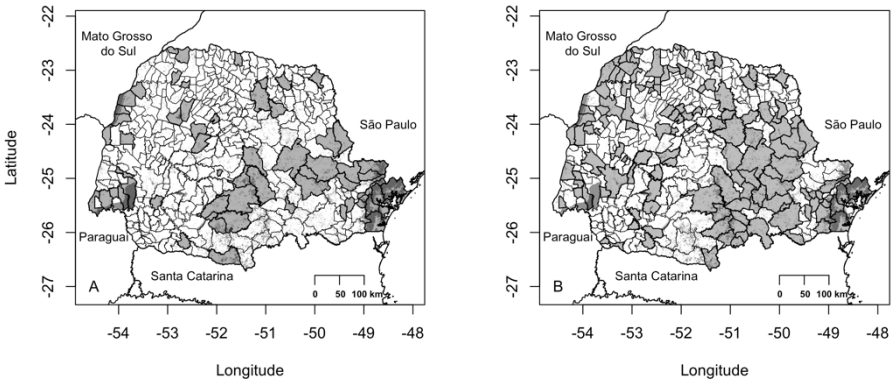


Figura 1. Municípios paranaenses onde se situam Unidades de Conservação de Proteção Integral (A) e de Uso Sustentável (B).

Proteção Integral

Estação Ecológica (ESEC). O Paraná possui oito ESEC, perfazendo um total de 20.267,7 ha distribuídos por sete municípios. Deste total, uma é área no âmbito federal do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), somando 13.638,9 ha, no município de Guaraqueçaba. Outras cinco são áreas no âmbito estadual (IAT), somando 6.603,3 ha, distribuídos em quatro municípios. Por fim, duas áreas estão dentro de âmbito municipal, somando 25,5 ha nos municípios de Campo Mourão e Paraíso do Norte.

A maior das ESEC é a do âmbito federal, ESEC Guaraqueçaba. A maior área no âmbito estadual é a ESEC Ilha do Mel (2.240,7 ha), município de Paranaguá.

Das cinco ESEC com planos de manejo disponíveis, quatro possuíam informações sobre a avifauna local (Tabela 2), as quais contam com um total de 519 espécies de aves, sendo 95 consideradas endêmicas da Mata Atlântica e 50, sob níveis de ameaça estadual, de modo que seis são criticamente ameaçadas, 15 são ameaçadas e 31, vulneráveis. Outras nove são classificadas como deficiente de dados (Tabela 2).

Parques Nacionais (PARNA). O Paraná possui cinco PARNA, perfazendo um total de 340.852,5ha distribuídos por 15 municípios. A maior área é o PARNA do Iguaçu (181.262,5 ha), nos municípios de Céu Azul, Foz do Iguaçu, Matelândia, Medianeira e São Miguel do Iguaçu.

Dos quatro PARNA com planos de manejo disponíveis, dois possuíam informações sobre a avifauna local (Tabela 2), os quais contam com um total de 198 espécies de aves, sendo 16 consideradas endêmicas da Mata Atlântica e 50, sob níveis de ameaça estadual, de modo que sete são criticamente ameaçadas, 10 são ameaçadas e 12, vulneráveis. Outras seis são classificadas como deficiente de dados (Tabela 2).

Parques Estaduais (PE). O Paraná possui 34PE, perfazendo um total de 82.269,0ha distribuídos por 40 municípios. O maior deles é o PE das Lauráceas (30.001,2 ha), municípios de Adrianópolis e Tunas do Paraná.

Dos 21PE com planos de manejo disponíveis, 16 possuíam informações sobre a avifauna local (Tabela 2), as quais contam com um total de 527 espécies de aves, sendo 128 consideradas endêmicas da Mata Atlântica e 55, sob níveis de ameaça estadual, de modo que 12 são criticamente ameaçadas, 21 são ameaçadas e 22, vulneráveis. Outras cinco são classificadas como deficiente de dados (Tabela 2).

Uso Sustentável

Áreas de Preservação Ambiental (APA). O Paraná possui 25APA, perfazendo um total de 2.532.243,8ha distribuídos por 52 municípios. Deste total, duas são áreas no âmbito federal do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), somando 1.294.557,0 ha distribuídos em sete municípios. Outras nove são áreas no âmbito estadual (IAT), somando 1.047504,2 ha, distribuídos em 38 municípios. Por fim,141 áreas estão dentro de âmbito municipal, somando 190.182,6 ha em 13 municípios.

A maior área no âmbito federal é a APAdas Ilhas e Várzeas do Rio Paraná, a qual conta com 1.003.059,0 ha localizados nos municípios de Diamante do Norte, Marilena, Nova Londrina, Porto Rico, Querência do Norte e São Pedro do Paraná. A maior área no âmbito estadual é a APAEstadual da Escarpa Devoniana (392.363,3 ha) nos municípios de Balsa Nova, Castro, Jaguariaíva, Lapa, Palmeira, Piraí do Sul, Ponta Grossa, Porto Amazonas, Sengés e Tibagi.

Das oitoAPA com planos de manejo disponíveis, três possuíam informações sobre a avifauna local (Tabela 2), as quais contam com um total de 353 espécies de aves, sendo 71 consideradas endêmicas da Mata Atlântica e 28, sob níveis de ameaça estadual, de modo que seis são criticamente ameaçadas, 15 são ameaçadas e oito, vulneráveis. Outras três são classificadas como deficiente de dados (Tabela 2).

Floresta Nacional (FLONA). O Paraná possui duas FLONA, perfazendo um total de 4.223,7 ha distribuídos por três municípios.A maior área é a FLONAdo Açungui, a qual conta com 728,7 ha localizados no município de Campo Largo.

As FLONA de Irati e do Açunguicontam com planos de manejo, porém apenas a primeirapossui informações sobre sua avifauna (Tabela 2), a qualdisponibiliza um total de 82 espécies de aves, sendo 39 consideradas endêmicas da Mata Atlântica e 16, sob níveis de ameaça estadual, de modo que duas são criticamente ameaçadas, nove são ameaçadas e cinco, vulneráveis. Outras duas são classificadas como deficiente de dados (Tabela 2).

Área de Relevante Interesse Ecológico (ARIE). O Paraná possui cinco ARIE, perfazendo um total de 1.867,1 ha distribuídos por cinco municípios. Deste total, uma (ARIE Guaraqueçaba) é área no âmbito federal do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), somando 109,0 ha no município homônimo. Outras três são áreas no âmbito estadual (IAT), somando 278,3 ha, distribuídos em três municípios. Por fim, uma área está dentro de âmbito municipal, somando 1479,7 ha na cidade de Santa Helena.A maior área no âmbito estadual é a ARIE de São Domingos (163,9 ha) no município de Roncador.

Das duasARIE com planos de manejo disponíveis (ARIE de Pinheiro e Pinheirinho e do Buriti), nenhuma possui dados sobre a avifauna.

Reservas Particulares do Patrimônio Natural (RPPN). O Paraná possui 273 RPPN, perfazendo um total de 61.116,4 ha distribuídos por 274 municípios.Deste total, 19 são áreas no âmbito federal do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), somando 13.474,3 ha distribuídos em 14 municípios. Outras 232são áreas no âmbito estadual (IAT), somando 47.618,5 ha, distribuídos em 99 municípios. Por fim, 21áreas estão dentro de âmbito municipal, somando 23,5 ha na cidade de Curitiba.

A maior área no âmbito federal é a RPPN Corredor do Iguaçu I, a qual conta com 5.151,0 ha localizados nos municípios de Novas Laranjeiras e Rio Bonito do Iguaçu. A maior área noâmbito estadual é a RPPN Reserva Natural Rio Cachoeira (4.292,8 ha)no município de Antonina. Em Curitiba, a RPPN Geronasso envolve a maior área, com 4,6 ha.

O município paranaense com o maior número de RPPN criadas é a capital, Curitiba, que conta com 21 áreas. No entanto, os municípios com a maior área de RPPN criada são Antonina (6.555,8 ha) eGuaraqueçaba, com 6.123,6 ha.

Das 27 RPPN com planos de manejo disponíveis, 14 possuíam informações sobre a avifauna local (Tabela 2), as quais contam com um total de 509 espécies de aves, sendo 118 consideradas endêmicas da Mata Atlântica e 42, sob níveis de ameaça estadual, de modo que cinco são criticamente ameaçadas, 21 são ameaçadas e 17, vulneráveis. Outras quatro são classificadas como deficiente de dados (Tabela 2).

Até 2009 havia 190 RPPN estaduais e federais, as quais cobriam área de 37.618,2 há (VICENTE; VANZELA; TOREZAN, 2009). Desde então, foram criadas 46 novas RPPN nestes âmbitos, aumentando em 30% a área de proteção da vegetação nativa para 54.081,5 ha.

3.1 Análises

Áreas de Proteção Integral (n = 22) possuem em média 162,7 (± 129,0) espécies, enquanto as de Uso Sustentável(n = 18) é de 136,6 (109,9). A distribuição das frequências das riquezas das UC não é normal (medianas respectivas 197,5 e 119,5), de modo que tais diferenças não são significativas (U = 215,5; p = 0,643). Entre as UC de Proteção Integral, são as Estações Ecológicas que possuem, significativamente, mais espécies de aves (Kruskal-Wallis = 2,9, g.l. = 2, p = 0,226; Mann-Whitney p < 0,392 nas três comparações), porém o mesmo não pode ser dito das comparações entre as UC de Uso Sustentável (Kruskal-Wallis = 0,7, g.l. = 2, p = 0,692; Figura 2). Com base apenas nesses dados não é possível determinar se áreas de Proteção Integral estão mais preservadas ou possuem mais espécies em relação às de Uso Sustentável, nem se há priorização na condução de estudos sobre o conhecimento das aves dentro de ESEC. Pode-se afirmar que, dentre as informações disponíveis, este é o estado da arte sobre a riqueza de aves nas UC paranaenses com base nos dados disponíveis.

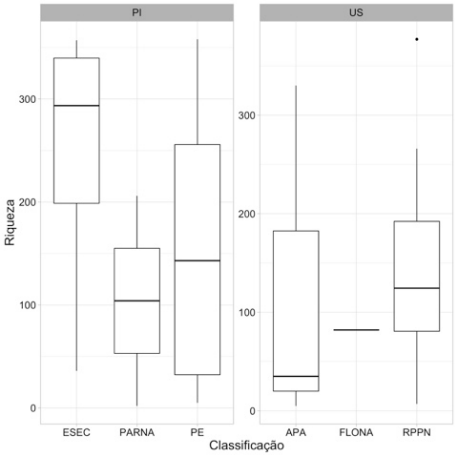


Figura 2. Número de espécies de aves registradas de acordo com categorias e classificações dasUnidades de Conservação paranaenses. Proteção Integral (PI): ESEC = Estação Ecológica, PARNA = Parque Nacional, PE = Parque Estadual. Uso Sustentável (US): APA = Área de Proteção Ambiental, FLONA = Floresta Nacional e RPPN = Reserva Particular do Patrimônio Natural.

As diferenças acima mencionadas resultam, também, do fato de que muitos dos planos de manejo não disponibilizam os apêndices com listagens de fauna, o que resultou na baixa riqueza apresentadas por tais UC (Figura3). Em outros casos, as listagens de fauna são conhecidas por estudos já publicados, como no caso, por exemplo do Parque Nacional do Iguaçu (STRAUBE; URBEN-FILHO; 2004; STRAUBE; URBEN-FILHO; CÂNDIDO-JR et al., 2004) e da RPPN Reserva Natural Salto Morato (STRAUBE; URBEN-FILHO, 2005) e, como consequência, estas UC não foram aqui contabilizadas, como descrito na seção Material e Métodos.

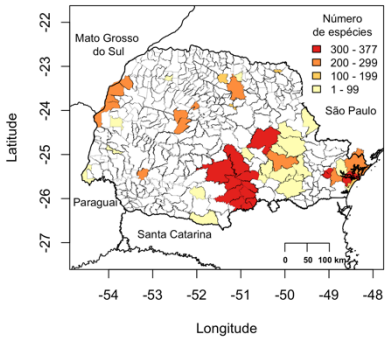


Figura 3. Número de espécies de aves registradas por municípios a partir de informações disponíveis em planos de manejo da Unidades de Conservação do estado do Paraná, sul do Brasil.

Nossos resultados evidenciam a ausência de informações básicas das UC

paranaenses. Apenas 71 (20%) das 360 UC possuem planos de manejo disponíveis nos sites dos responsáveis por sua manutenção, dos quais apenas 40 (60%) permitem acesso às informações sobre suas avifaunas. Embora a evidente importância das UC seja inquestionável, bem como o Estado tem se esforçado para garantir sua importante política de sistematização com criação de novas áreas e do SNUC, a falta de conhecimento básico disponível é preocupante. Mesmo quando estas possuem planos de manejo, a ausência de acessibilidade inviabiliza a condução de esforços para a contribuição do conhecimento sobre a biodiversidade. Sugerimos que, além de as UC paranaenses disponibilizarem seus dados já existentes para consulta por parte de pesquisadores e pela comunidade não acadêmica, novos estudos sobre informação e conhecimento básicos sejam instigados dentro de seus territórios.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos àFundação Araucária pelo fomento da bolsa de Iniciação Científica (PIBIC-FA) para ABB, e ao Ângelo Simão, da Confederação Nacional de RPPN (CNRPPN) e à Tereza Hoffman, da seção de Pagamentos por Serviços Ambientais (PSA/RPPN), por fornecerem importantes informações sobre as Unidades de Conservação do estado do Paraná.Contribuíram com leituras críticas à primeira versão deste manuscrito Josiane B. Traldi e Paula F. M. Rodrigues. Laís S. Porto auxiliou com a coleta de dados e James. R. Roper contribuiu com análises.

REFERÊNCIAS

BRASIL.**Leinº 9.985, de 18 dejuhode 2000**. Regulamenta o art. 225, § 1º, incisos I, II, III e VII da Constituição Federal, institui o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza e dá outras providências. Brasília: Conselho Nacional do Meio Ambiente. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L9985.htm. Acesso em 02 dez. 2020.

FIGUEIREDO, M. S. L.; WEBER, M. M.; BRASILEIRO, C. A.; CERQUEIRA, R.; GRELLE, C. E. V.; JUNKINS, C. N.; SOLIDADE, C. V.; TOMé, M. T. C.; VALE, M. M.; LORINI, M. L. Tetrapod Diversity in the Atlantic Forest: Maps and Gaps. *In*: MARQUES, M. C. M.; GRELLE, C. E. V. **The Atlantic Forest. History, Biodiversity, Threatsand Opportunities of the Mega-diverse Forest**. 1. Ed. Gewerbestrasse: Springer, 2021. p. 185-204.

INSTITUTO TERRA E ÁGUA. **Dados sobre RPPN no Estado do Paraná**. Curitiba: IAT, 2020. Disponível em: http://www.iat.pr.gov.br/Pagina/Reserva-Particular-do-Patrimonio-Natural-RPPN. Acesso em: 02 dez. 2020.

INTERNATIONAL UNION FOR NATURE CONSERVATION. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Cambridge: IUCN, 2019. Disponível em: https://www.iucnredlist.org. Acesso em: 02 dez. 2020.

MAACK, R. **Geografia física do Estado do Paraná.**4 ed. Ponta Grossa: UEPG, 2017. 526p.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Unidades de Conservação. O que são**. Brasília: MMA, 2020. Disponível em: http://www.mma.gov.br. Acesso em 14 jul. 2020.

PARANÁ. Decreto nº 11.797, de 22 de novembro de 2018. Reconhece e atualiza lista de espécies de aves pertencentes à fauna silvestre ameaçadas de extinção no estado do Paraná e dá outras providências, atendendo o Decreto Nº 3.148, de 2004. **Diário Oficial do Paraná**, Curitiba, PR, ano n. 10319, p. 13-16, 23 nov. 2018.

PIACENTINI, V. Q.; ALEIXO, A.; AGNE, C. E.; MAURÍCIO, G. N.; PACHECO, J. F.; BRAVO, G. A. et al. Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee / Lista comentada das aves do Brasil pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 23, n. 2, p. 91-298, 2015.

REZENDE, C. L.; SCARANO, F. R.; ASSAD, E. D.; JOLY, C. A.; METZGER, J. P.; STRASSBURG, B. B. N.; TABARELLI, M.; FONSECA, G. A.; MITTERMEIER, R. A. From hotspot to hopespot: An opportunity for the Brazilian Atlantic Forest. **Perspectives in Ecology and Conservation**, vol. 16, n. 4, p. 208-214, 2018.

RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M. M.The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**,v. 142, n. 6, p. 1141-1153, 2009.

SCHERER-NETO, P.; STRAUBE, F. C.; CARRANO, E.; URBEN-FILHO, A. **Lista das aves do Paraná**. 1 ed. Curitiba: Hori Cadernos Técnicos, 2011. 130p.

SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, Instituto de Pesquisas Espaciais. **Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica**. Relatório Técnico, período 2017-2018. 1. ed. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica, 2019. 56p.

STRAUBE, F. C.; URBEN-FILHO, A. Uma revisão crítica sobre o grau de conhecimento da avifauna do Parque Nacional do Iguaçu (Paraná, Brasil) e áreas adjacentes. **Atualidades Ornitológicas**, v. 118, p. 6-33, 2004.

STRAUBE, F. C.; URBEN-FILHO, A. Avifauna da Reserva Natural Salto Morato (Guaraqueçaba, Paraná). **Atualidades Ornitológicas**, v. 124, p.12-33, 2005.

STRAUBE, F. C.; URBEN-FILHO, A.; CÂNDIDO JR, J. F. Novas informações sobre a avifauna do Parque Nacional do Iguaçu (Paraná). **Atualidades Ornitológicas**, v. 120, p.10-27, 2004.

VALE, M. M; TOURINHO, L.; LORINI, M. L.; RAJÃO, H.; FIGUEIREDO, M. S. L. Endemic birds of the Atlantic Forest: traits, conservation status, and patterns of biodiversity. **Journal of Field Ornithology**, v. 89, n. 3, p. 193-206, 2018.

VICENTE, R. F.; VANZELA, A. L. L.; TOREZAN, J. M. D. Representatividade de ecossistemas no sistema de unidades de conservação no Estado do Paraná, Brasil. **Natureza & Conservação**, v. 7, p. 50-66, 2009.

CAPÍTULO 10

ESTUDO DO FUNGO *Rhizopus stolonifer* CONHECIDO COMO BOLOR PRETO DO PÃO

Data de aceite: 26/05/2021
Data de submissão: 09/04/2021

Laryany Farias Vieira Fontenele
Instituto Federal do Pará – IFPA
Conceição do Araguaia, Pará
http://lattes.cnpq.br/9492972376768641

Aliny Lima de Sousa
Instituto Federal do Pará – IFPA
Conceição do Araguaia, Pará
http://lattes.cnpq.br/3227909687896288

Luana de Mikelle Rodrigues Pereira
Instituto Federal do Pará – IFPA
Conceição do Araguaia, Pará
http://lattes.cnpq.br/1039887185786399

RESUMO: O fungo *Rhizopus stolonifer* conhecido como bolor preto do pão, causador de doenças em seres humanos, assim como também participam do processo de decomposição. Seus esporos dispersam facilmente pelos alimentos através do ar que é acelerado por temperaturas elevadas e umidade relativa alta, local propício para o desenvolvimento dos fungos, caracterizado pelo desenvolvimento do mofo. O estudo foi aplicado com vinte estudantes do Ensino Médio Integrado em Agropecuária do IFPA, que estudaram sobre o desenvolvimento dos microrganismos. Foi dividido em dois grupos de pesquisa que ao longo de duas semanas coletaram dados sobre a espécie fúngica e seu filo *Zygomycota*. Próxima etapa foi a de observar o amadurecimento de frutas e de pães para anotar dados e fotografar o desenvolvimento dos esporos do fungo em estudo. Os fungos foram observados ao microscópio óptico no laboratório de Fitopatologia do IFPA, onde foi utilizado os materiais: pinça, placa de petri, conta-gotas, lâminas (raspagem), fita adesiva (coleta dos esporos), jornais, água destilada e microscópios ópticos. Através da observação microscópica foi possível identificar e caracterizar as hifas, micélios, esporos e esporângios.

PALAVRAS-CHAVE: Reino Fungi. Filo *Zygomycota.* Família *Mucoraceae.*

STUDY OF THE RHIZOPUS STOLONIFER FUNGI KNOWN AS BLACK BREAD BOLOR

ABSTRACT: The fungi *Rhizopus stolonifer* known as black mold of bread, which causes diseases in humans, as well as participating in the decomposition process. It`s spores are easily dispersed by food through the air, which is accelerated by high temperatures and high relative humidity, a favorable place for the development of fungi, characterized by the development of mold. The study was carried out with twenty students from the Integrated High School in Agriculture at IFPA, who studied the development of microorganisms. It was divided into two research groups that over two weeks collected data on the fungi species and its phylum *Zygomycota*. The next step was to observe the ripening of fruits and breads to record data and photograph the development of the fungi spores under study. The fungi were observed under an optical microscope at the IFPA Phytopathology laboratory, where the materials were used: tweezers, petri dishes,

droppers, blades (scraping), adhesive tape (spore collection), newspapers, distilled water and optical microscopes. Through microscopic observation it was possible to identify and characterize hyphae, mycelia, spores and sporangia.
KEYWORDS: Fungi Kingdom. Phylum *Zygomycota*. Family *Mucoraceae.*

1 I INTRODUÇÃO

Do Reino Fungi, os fungos são encontrados no solo, na água, nos vegetais, nos animais e nos homens. São classificados em saprófagos, parasitas e predadores de acordo com a alimentação. A ciência que os estuda os fungos é a micologia, responsável por detalhar suas características, propriedades genéticas e bioquímicas, sua taxonomia e seu uso para seres humanos. Os fungos podem trazer benefícios ou prejuízos para a sociedade, e isso pode variar de acordo com o estado e o local em que ele se encontra (RAVEN, 2001).

Depois dos insetos que pertencem ao filo dos artrópodes que é o grupo de organismo mais biodiverso do planeta, os fungos possuem diversidade de mais de um milhão e meio de espécies e superestimada em mais de cinco milhões, sendo que apenas mais de 97 mil espécies estão registradas. Muitas espécies ainda não foram catalogadas devido a ambientes poucos explorados ou falta de especialistas da área (Raven, 2001). Sua reprodução pode ocorrer de forma sexuada ou assexuada, e fazem parte do ciclo de decompositores da matéria orgânica e de reciclagem de nutrientes, desempenhando um papel importante no ciclo dos ecossistemas (LINHARES, 2016).

Os fungos são organismos eucarióticos, heterotróficos, uni ou pluricelular e se nutrem por absorção. Vivem no solo, na água ou no corpo de outros seres vivos. São agentes decompositores, cuja função é decompor resto de organismos (AMABIS, 2016).

Os fungos são constituídos por filamentos chamados de hifas, podendo ser elas cenocíticas ou septadas, onde está contido o material celular do microrganismo. O conjunto das hifas forma o micélio que formam o corpo do fungo (LINHARES, 2016).

A nutrição heterotrófica desses seres vivos é por absorção, que é justamente essa a causa de formarem bolores nos alimentos. A maioria das espécies são sapróbias, se alimentam de outros organismos. Alguns se nutrem de matéria orgânica viva ou são parasitas de animais e plantas (PUTZKE *et. al*. 1998).

São classificados no filo Zygomycota (zigomicetos), famílias *Mucoraceae,* não possuem corpo de frutificação durante o processo de reprodução sexuada, são multicelulares com hifas cenocíticas e podem causar doenças em seres humanos chamados zigomicoses (PUTZKE *et. al*. 1998).

O filo zygomycota compreende aproximadamente 1% das espécies descritas de fungos, cerca de 900 espécies inversamente (Kirk et. al. 2008). Algumas espécies tem impacto negativo na economia humana por causarem a podridão dos grãos e frutos, enquanto outras espécies oportunistas causam infecções em pacientes diabéticos, imuno-

deficientes e imuno-suprimidos. Apesar destes fungos serem comuns em ecossistema terrestre e aquático, são raramente relatados em humano (HOOG *et. al*. 1995).

Seu nome é Rhizopus stolonifer, ou bolor-preto-do-pão é um fungo da ordem Mucorales, com uma distribuição cosmopolita, principalmente saprófito, crescem em frutas podres e no pão. Durante sua fase reprodutiva, ele pode ser visto como um bolor preto e peludo, essa espécie de fungo também pode causar uma infecção no rosto e na orofaringe de humanos, mas mais frequentemente ela pode ser um patógeno de muitas espécies de plantas (PUTZKE *et. al*. 1998). Devido à sua biodiversidade e capacidade de adaptação em diversos meios, há muitos estudos sendo elaborados como forma de tentar impedir sua infestação e ocasionar outras doenças.

2 I OBJETIVO GERAL

- Descrever o fungo *Rhizopus stolonifer* causador da decomposição de alimentos ricos em carboidratos.

2.1 Objetivos específicos

- Conhecer o filo do fungo *Rhizopus stolonifer;*
- Caracterizar as partes do fungo *Rhizopus stolonifer;*

3 I METODOLOGIA

O conteúdo sobre o Reino Fungi foi trabalhado na turma do Ensino Médio Integrado em Agropecuária XB (20 estudantes) do Instituto Federal do Pará - IFPA, descrevendo as partes dos fungos, filo em estudo e formas de reprodução assexuada e sexuada. Foi dividido em dois grupos de pesquisa que ao longo de duas semanas coletaram dados sobre a espécie fúngica e seu filo *Zygomycota*. Ao término da pesquisa foi realizado uma socialização em grupo sobre as informações reunidas. Próxima etapa foi a de observar o amadurecimento de frutas e de pães para anotar dados e fotografar o desenvolvimento dos esporos do fungo em estudo. Foi anotado a quantidade de dias de desenvolvimento do fungo que passou dos estágios da cor branca para a cor preta. Os fungos foram observados ao microscópio óptico no laboratório de Fitopatologia do IFPA, caracterizados e descritos logo a seguir.

4 I RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira parte do experimento colocamos o pão para apodrecer e acompanhamos o aparecimento do bolor preto do pão. Esperamos oito dias, anotamos e registramos a decomposição da matéria orgânica. Foi realizado no período de 23 a 30 de outubro de

2019 (Figura 1). É possível verificar que o tamanho da amostra diminui à medida que o crescimento do fungo aumenta, comprovando a decomposição que é uma característica da atividade fúngica (PUTZKE *et. al*. 1998).

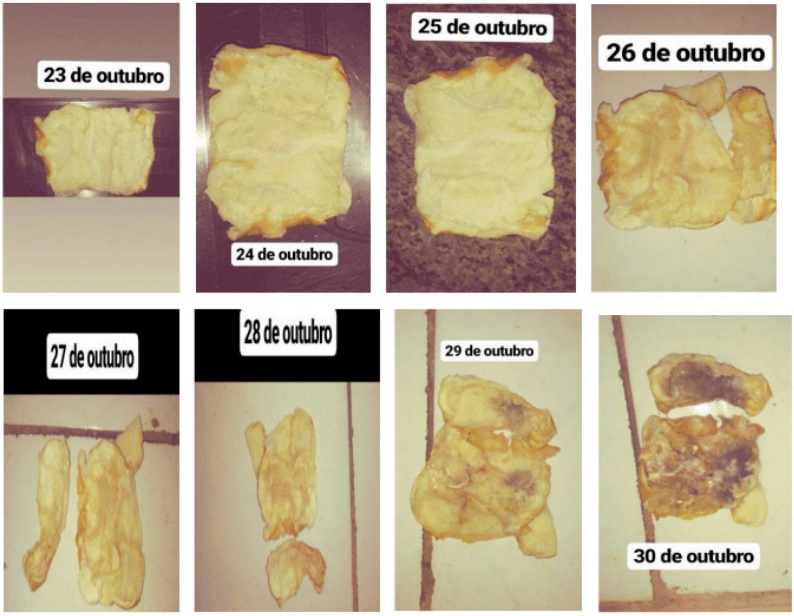


Figura 1 – Apodrecimento do pão para analisar as partes fúngica do bolor preto do pão.

Logo em seguida a preparação do material foi realizada no laboratório de Fitopatologia, do IFPA, onde foi utilizado: pinça, placa de petri, conta-gotas, lâminas (raspagem), fita adesiva (coleta dos esporos), jornais, água destilada e microscópios ópticos (Figura 2 a 7).

Figura 2 a 7 – Preparação das lâminas para a observação das estruturas fúngica.

Próprio autor, 2019

Foi possível observar as partes das hifas, micélios, esporos e esporângios.

As hifas são células fúngicas que se agrupam em filamentos, podendo ou não apresentar septos entre elas**,** o crescimento das hifas é apical, porém, existem algumas regiões com extrema capacidade de crescimento, principalmente aquelas relacionadas às funções reprodutivas. As hifas podem ser contínuas ou cenocíticas e tabicadas ou septadas (SILVA e COELHO, 2006) (Figura 8).

Os micélios são um agrupamento intenso de hifas e é importante lembrar que

micélios fúngicos nunca constituem tecidos, se desenvolvem no interior do substrato, funcionando também como elemento de sustentação e de absorção de nutrientes (SILVA E COELHO, 2006) (Figura 8).

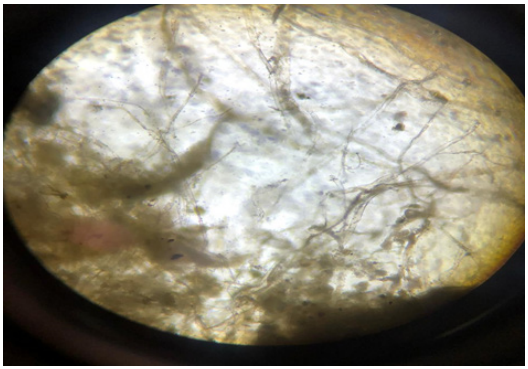


Figura 8 – Hifas observadas no fungo Bolor preto (*Rhizopus stolonifer).*

Próprio autor, 2019

Os esporos são propágulos ou órgãos de disseminação dos fungos, são classificados segundo sua origem em assexuados: são produtos da divisão mitótica de uma única célula parental. Sexuados: são formados através do processo de fusão de dois núcleos parentais, seguida por meiose (SILVA E COELHO, 2006) (Figura 9).

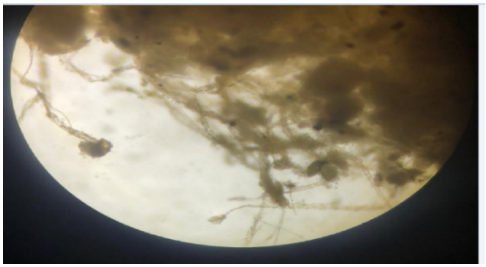


Figura 9 – Esporos - propágulo de disseminação dos fungos.

Próprio autor, 2019

E os esporângios que é uma estrutura em forma de “bolsa” onde os esporos ficam alojados prontos para serem liberados, pode ser composto por uma única célula ou ser multicelular (SILVA E COELHO, 2006) (Figura 10).

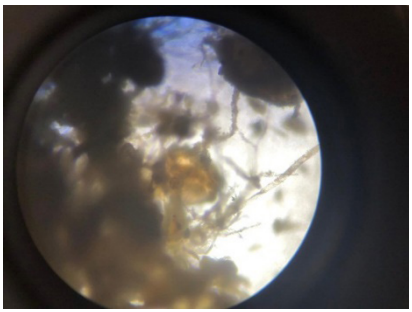


Figura 10 – Esporângios se desenvolvem em estrutura arredondada local de absorção dos nutrientes.

Próprio autor, 2019

Após a observação microscópica foi possível caracterizar as hifas, micélios, esporos e esporângios. O crescimento fúngico altera tanto a composição química dos alimentos quanto a estrutura, fazendo com que esse seja descartado, resultando assim na perda econômica e desperdício de matéria prima (ABREU, 2003). Um fator que foi explicado quanto às grandes colheitas que precisam correr contra o tempo para o período de colheita e transporte dos alimentos, evitando assim a proliferação dos fungos e perda de mercadoria. A época do experimento favoreceu o crescimento rápido das hifas, onde a temperatura é um fator essencial para o crescimento dos fungos.

5 I CONCLUSÃO

O estudo dos microrganismos, fungos, é importante devido à participação desses na cadeia alimentar, onde atuam como agentes decompositores. A saúde alimentar e adequação dos alimentos ingeridos pela sociedade são um tema de ampla abordagem e necessita de estudos que relacione as estruturas fúngica e o risco com as doenças. O estudo sobre o fungo *Rhizopus stolonifer* favoreceu identificar e caracterizar as partes dos fungos assim como acompanhar o período de apodrecimento dos alimentos.

REFERÊNCIAS

ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. Implantação e manutenção da coleção de Culturas de microrganismos do UniCEUB. Brasília: Universitas Ciências da Saúde, v.02 n.2, pp. 236-251, 2003.

AMABIS e MARTHO. **Biologia**. Editora Moderna, v.2, São Paulo: 2016.

HOOG, G.S. & Guarro, J. 1995. **Atlas of Clinical Fungi**. Delft, Centraalbureau voor Schimmelcultures.

KIRK P.M. *et. al.* (eds.) 2008. **Dictionary of the Fungi**, 11th ed. Wallingford: CABI Publishing.

LINHARES, S. *et. al*. Biologia Hoje. 3 ed. v.2. **Os seres vivos**. São Paulo: Ática, 2016.

RAVEN, Peter; EVERT, Ray F.; EICCHORN, Susan E. **Biologia Vegetal** (6ª ed.), Ed. Guanabara Koogan, RJ. 2001.

SILVA, R. R.; COELHO, G. D. **Fungos principais grupos e aplicações biotecnológicas**. São Paulo, SP: Instituto de Botânica - IBt. 2006.

PUTZKE, J. ; PUTZKE, M. T. L. **Os Reinos dos Fungos**. Vol. I. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 1998.

CAPÍTULO 11

O PROFESSOR "IDEAL" NA VISÃO DE ALUNOS DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA: UM ESTUDO DESCRITIVO

Data de aceite: 26/05/2021
Data de submissão: 06/05/2021

Edla Helena Salles de Brito
Universidade de Fortaleza- UNIFOR
Fortaleza-CE
http://lattes.cnpq.br/2439481133697633

Débora Rosana Alves Braga
Universidade de Fortaleza, Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva
Fortaleza-Ceará
http://lattes.cnpq.br/6367310280029658

Dulce Maria de Lucena Aguiar
Universidade de Fortaleza- UNIFOR
Fortaleza-CE
http://lattes.cnpq.br/5355564480572942

Maria Elisa Machado Ferreira Marcelo
Universidade de Fortaleza- UNIFOR
Fortaleza-CE
http://lattes.cnpq.br/4330252274453693

Maria Vieria de Lima Saintrain
Universidade de Fortaleza, Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva
Fortaleza-Ceará
http://lattes.cnpq.br/4640029618752231

RESUMO: O ensino de odontologia apresenta constantemente a necessidade de adaptação e aprimoramento, especialmente quanto à qualificação dos docentes. O objetivo deste estudo descrever qualidades pessoais e profissionais de um "professor ideal", sob a visão de discentes do curso de odontologia. Trata-se de um estudo descritivo, observacional, do tipo transversal, com abordagem quantitativa realizado através de um questionário com alunos de graduação em Odontologia de uma Universidade privada no município de Fortaleza, Ceará. Um total de 361 alunos participaram da pesquisa, prevalecendo: 21,7 anos de idade (DP± 4,0); 257 (71,2%) do sexo feminino; e 184 (51%) cursando do quinto ao décimo semestre. Quanto às qualidades pessoais de um professor ideal, a maioria caracterizou como indispensável: a ética (77,3%); a capacidade de escutar o outro (71,5%); o bom senso (68,7%); a coerência (67%); e a compreensão (64,5%). Para as características profissionais, destacaram-se: comprometimento (76,5%); coerência nos processos avaliativos (70,1%); planejamento (251;69,5%); didática (247;68,4%); comunicação eficaz (235;65,1%); atualização (228;63,2%). Tanto os atributos pessoais quanto profissionais elencados estão relacionados com a expectativa em alcançar o bom desempenho no curso e ratificam a imagem do professor como exemplo a ser seguido em diversos âmbitos de suas vivências dos discentes.

PALAVRAS-CHAVE: Ensino. Educação Superior. Docentes de Odontologia.

THE "IDEAL" TEACHER IN THE VIEW OF UNDERGRADUATE STUDENTS IN DENTISTRY: A DESCRIPTIVE STUDY

ABSTRACT: The teaching of dentistry is always in need of adaptation and improvement, especially regarding the qualification of teachers.

The objective is to study the personal and professional characteristics of an “ideal teacher”, under the view of students of the dentistry course. This is a descriptive, observational, cross-sectional study, with a quantitative approach, carried out through a questionnaire with undergraduate dentistry students from a private university in the city of Fortaleza, Ceará. A total of 361 students participated in the survey, with the following prevailing: 21.7 years of age (SD ± 4.0); 257 (71.2%) were female; and 184 (51%) studying from the fifth to the tenth semester. As for the personal qualities of an ideal teacher, the majority characterized as essential: ethics (77.3%); the ability to listen to the other (71.5%); common sense (68.7%); consistency (67%); and understanding (64.5%). For professional characteristics, the following stood out: commitment (76.5%); consistency in the evaluation processes (70.1%); planning (251; 69.5%); didactic (247; 68.4%); effective communication (235; 65.1%); update (228; 63.2%). Both the personal and professional attributes listed are related to the expectation of achieving good performance in the course and ratify the image of the teacher as an example to be followed in various areas of their students’ experiences.
KEYWORDS: Teaching. College education. Dentistry teachers.

1 I INTRODUÇÃO

As práticas de ensino estão em constante adaptação e evolução. Ao passo que novas demandas surgem, leis, diretrizes, ferramentas, softwares são construídos ou aprimorados a fim de que se mantenha e/ou amplifique a qualidade dos sistemas de educação. Da mesma maneira, faz-se necessário que os docentes acompanhem essas adaptações, considerando as particularidades de cada área (BOWEN, 2020).

No ensino da odontologia, torna-se indispensável a aprendizagem baseada no rigor técnico-científico, destreza manual atrelada ao perfil humanista, crítico e reflexivo, para que o futuro profissional possa atuar em todos os níveis de atenção à saúde (EMMI *et al*., 2018).

Dentre os esforços para atingir essa finalidade, ter docentes capacitados e qualificados é de grande importância para o progresso do aluno durante o curso de graduação (FELDEN, 2017). No entanto, existem dificuldades enfrentadas pelos docentes em saúde, principalmente, por se sentirem pouco preparados para desempenhar essa função, uma vez que os cursos de graduação desta área têm como objetivo principal a formação na atenção à saúde (FREITAS *et al*., 2016).

Diante das mais variadas exigências requeridas para qualificar um bom professor, esse estudo tem como objetivo descrever qualidades pessoais e profissionais de um “professor ideal”, sob a visão de discentes do curso de odontologia.

2 I METODOLOGIA

Estudo descritivo, observacional, do tipo transversal, com abordagem quantitativa realizado com alunos de graduação em Odontologia de uma Universidade privada de

referência Norte-Nordeste do Brasil, no município de Fortaleza, Ceará. A população da pesquisa foi composta por 736 estudantes com idade de 18 anos ou mais, regularmente matriculados, cursando do primeiro ao décimo semestre. O cálculo amostral foi por base na população total de alunos com uma margem de erro de 5% e um coeficiente de confiança de 95%, que resultou no tamanho da amostra estimado de 253 pesquisados, todavia, foram selecionados 361 questionários.

Como critérios de inclusão constituem-se: alunos do curso de Odontologia, devidamente matriculados do primeiro ao decimo semestres, com idade maior que 18 anos, que aceitaram participar da pesquisa tendo assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Foi considerado como critério de exclusão alunos ausentes nos dias escolhidos para coleta dos dados.

O questionário versou sobre variáveis que foram classificadas de acordo com os seguintes blocos: 1) aspectos demográficos: sexo, idade e semestre em curso; 2) qualidades pessoais do professor "ideal" por nível de prioridade: "indispensável", "importante", "pouco importante"; 3) qualidades profissionais do professor "ideal" por nível de prioridade: "indispensável", "importante", "pouco importante". O instrumento foi aplicado em sala de aula, de forma coletiva, depois de explicitados os objetivos e procedimentos da pesquisa para os participantes.

Após coleta, os dados foram consolidados em planilhas do Excel e categorizados para análise mediante estatística descritiva e inferencial.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Fortaleza sob Parecer 1.919.067.

3 I RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 361 alunos participaram da pesquisa, sendo estes com idade média de 21,7 anos (DP± 4,0); 257 (71,2%) do sexo feminino; e 184 (51%) cursando do quinto ao décimo semestre, o que pode explicar a média de idade encontrada.

Esse resultado corrobora a feminização dos cursos de formação em saúde, especialmente a odontologia, caracterizada, historicamente, como uma profissão tipicamente masculina. No entanto, o termo feminização deve ser entendido tanto como a alteração quantitativa de mulheres nos setores de trabalho, bem como a modificação qualitativa de atributos de gênero associados às atividades desenvolvidas dentro das ocupações (COSTA *et al.*, 2010, MINELLA, 2017). Costa *et al.* (2010) mostrou que um curso de graduação em Odontologia em uma Universidade estadual do sudeste do Brasil, apresentou maior porcentagem de mulheres, desde a procura pelo curso, tanto com relação aos ingressos, como aos formados. Da mesma forma, estudo em Universidade estadual da região nordeste mostrou maior prevalência de concluintes do sexo feminino no curso de odontologia (QUERINO; PEIXOTO; SAMPAIO, 2018).

Quanto às qualidades pessoais de um professor ideal para o curso de Odontologia, por ordem de prioridade, a maioria dos discentes disseram ser a ética (279;77,3%); a capacidade de escutar o outro (258;71,5%); o bom senso (248;68,7%); a coerência (242;67%); e a compreensão (233;64,5%) características indispensáveis para tal. Como atributos importantes obtiveram-se: bom humor (226;62,5%); flexibilidade (209;57,9%); e empatia (189;52,4%). Apenas 58 (16%) dos respondentes classificaram as qualidades na condição de pouco importantes, dentre essas estão: bom humor (14;3,9%); e humildade (12;3,3%).

Rangel (1994), retrata em seu livro "Representação e reflexões sobre o bom professor" que a opinião das pessoas sobre o bom professor é um dado importante, pois essa informação é uma dimensão da representação social que expressa a organização do conhecimento sobre e como este se organiza no curso das vivências diárias.

Finkler (2009) relata a influência que o professor exerce como modelo de habilidade técnica; postura ética; de ponte entre o conhecimento disponível e as estruturas cognitivas, culturais e afetivas dos alunos, bem como exemplo de conduta. Isso elucida o fato de a ética ter sido o atributo mais priorizado pelos estudantes, uma vez que muitos visualizam, nos professores, um reflexo de dos profissionais que serão no futuro, buscando enaltecer a priorização de valores e princípios no âmbito trabalhista.

Ademais, é notório que as qualidades mais citadas sejam aquelas das quais os alunos demonstrem maior premência durante o curso. Sendo a grade do curso de odontologia de regime integral, exigindo alta dedicação por parte dos estudantes, muitos esperam ser compreendidos diante das dificuldades técnicas que as disciplinas exigem, bem como das repercussões emocionais muitas vezes demonstradas tais como: ansiedade, estresse, baixa auto-estima, sentimento de incapacidade, dentre outras (LEAO *et al.*, 2018). Diante disso, querem contar com a flexibilidade dos professores, no sentido de esses entenderem que o processo de aprendizado é individual, principalmente devido à alta demanda de destreza manual e prática a que são exigidas para que o aluno seja aprovado nas disciplinas pré-clínicas e de clínicas.

Semelhantemente, essas características podem ser elencadas pelos alunos que se depararam com situações as quais foram requeridas tais atitudes durante as práticas clínicas. A odontologia, por ser uma profissão da área da saúde, preza pela humanização no cuidado e isso requer empatia e escuta qualificada para entender os fatores determinantes que levaram ao adoecimento do paciente, além do bom senso para planejamento e resolução dos casos clínicos (SILVA NETO *et al.*, 2020). Nesses momentos, os alunos são motivados a aprender essa postura através das condutas dos professores.

Em se tratando das características profissionais, prevaleceram: comprometimento (276;76,5%); coerência nos processos avaliativos (253;70,1%); planejamento (251;69,5%); didática (247;68,4%); comunicação eficaz (235;65,1%); atualização (228;63,2%) como indispensáveis aos professores ideias. Os atributos de competência no uso das

tecnologias (252; 69,8%); experiência profissional (184;51%); capacidade de trabalhar em grupo (166;46%) foram julgados, pelos alunos, como importantes. Semelhantemente às qualidades pessoais, poucos discentes classificaram qualidades profissionais no quesito pouco importantes (45;12,5%), sendo que a maioria das repostas (27;7,5%) considerou a competência no uso das tecnologias não muito relevante para denominar um bom professor.

Em relação à coerência nos processos avaliativos, pode-se denotar a importância que os discentes dispõem sobre a ideia de o aprendizado estar atribuído às notas de que precisam para serem aprovados nas disciplinas. Existe uma forte preocupação de que o professor ensine o que será cobrado nas provas, pois o objetivo final é avançar para o próximo semestre do curso.

Essa é uma realidade que perpassa por todo o sistema de ensino brasileiro, no qual tanto o rendimento dos professores quanto dos alunos, são avaliados através de notas numéricas (DAMASCENO; COSTA; NEGREIROS, 2016). Diante disso, os testes ainda são considerados o maior motivo de diligência por parte dos alunos, que estendem a mesma cobrança para o docente ideal.

Para Cruz *et al*. (2017), existe uma tríade de atributos que dão forma à aula de um bom professor: o conhecimento que será transmitido aos alunos; o planejamento que consiste na programação; e a didática que se qualifica na forma como o professor interage entre o conhecimento, o planejamento e a transmissão aos alunos, corroborando o que foi exposto pelos alunos desta pesquisa como qualidades indispensáveis ao professor ideal.

Guimarães (2014) ratifica sobre a importância da prática didático pedagógica do professor como condição necessária para promover a aprendizagem ativa do aluno, entendendo a relevância da problematização, da reflexão, da criticidade, da compreensão e do conhecimento por meio da conjugação de questões que tratam sobre o mercado de trabalho, a competência e a formação do futuro profissional.

Para tanto, pode-se dizer que a comunicação eficaz, exposta como atributo importante pelos respondentes, atualmente, está intimamente relacionada com o uso de tecnologias de informação que se tornaram facilitadores nesse processo de fortalecimento de vínculo entre professor e aluno. Em geral, essas plataformas oferecem a possibilidade de publicar o horário das aulas no calendário virtual, responder perguntas dos alunos e até discutir casos clínicos através de *chats*, além das aulas por videoconferência. É possível enviar material didático, postar vídeos, conduzir fóruns de discussão, tarefas, avaliações e organizar a comunicação pessoal com os alunos (BOWEN *et al*., 2020).

Dentre as mais diversas vantagens, estão o fato de serem universais, estruturadas e de fácil condução pelos alunos, sendo consideradas por viabilizarem método dinâmico. Logo, quanto mais o professor lança mão de instrumentos que viabilizem melhor comunicação com o aluno, mais estimado se torna.

Perante o exposto, ainda como qualidade indispensável priorizada pelos discentes, tem-se a atualização. Mello e Freitas (2018) discutiram sobre inovação do docente

universitário como um elemento crucial à qualidade da educação e isso está atrelado, principalmente, ao compromisso da gestão institucional com a promoção de condições para a formação pedagógica, contando com as manifestações de aspectos intrínsecos do desenvolvimento profissional e seu significado enquanto prática social. Ou seja, a busca por atualização conta com a auto reponsabilidade do professor e da instituição em oportunizá-la.

Além disso, junto dos fatores tidos como importantes para compor um docente, chama atenção para alto número de respondentes sobre a competência do uso de tecnologias. No ano de 2020, diversas universidades em todo o mundo tiveram que se adequar a novas modalidades de ensino devido à pandemia da Covid-19 e às sequentes medidas restritivas de isolamento social. O ensino remoto, em formato virtual, foi eleito como principal meio para viabilizar as práticas docentes.

Todavia, estudos mostraram limitações no ensino odontológico através desses recursos, mostrando ser necessário o apoio das instituições na capacitação dos docentes. Mardani *et al.* (2020) apontaram que as aprendizagens baseadas em paciente virtual ensinam o pensamento crítico, mas não substituem as experiências de atendimento ao paciente. Pontual e seus colaboradores (2020) demonstraram dificuldades para desenvolvimento de metodologias ativas, participação dos alunos e prejuízo assimilação dos conteúdos de clínicos. Quinn *et al.* 2020, relatou dificuldades nos processos avaliativos.

Antonelli *et al*. (2018) já destacavam que os discentes nascidos na era da tecnologia da informação, conhecida Geração Y, quando ingressam no ensino superior defrontam-se com docentes de gerações anteriores (Baby Boomerse Geração X), os quais não tiveram a mesma formação tecnológica, favorecendo hiatos na interlocução entre professores e alunos.

Assim, considerando que dispositivos de acesso à internet, redes sociais e ambiente virtual são largamente utilizados por estudantes, cotidianamente, certifica-se tendência crescente de adequação de práticas metodológicas nesses espaços, o que vem a ser, no ideário do aluno, aspectos positivos para o professor que as maneja com precisão (DAS *et al*., 2020).

A experiência profissional também foi amplamente aceita como característica importante para um professor ideal e isso pode estar relacionado tanto com a trajetória do docente em sala de aula como na carreira profissional de dentista. Uma das metodologias aplicadas no ensino de odontologia, são as discussões de casos clínicos, logo, quanto mais conhecimento técnico e experiência profissional o professor demonstra, transmite maior credibilidade e maior interesse do aluno pelo conteúdo (DE-CARLI *et al*., 2019).

Existem ainda muitos fatores que constituem a imagem de um professor ideal. Estudo de Medina, Bezerra e Gouvêa (2019) com alunos de odontologia, avaliou que a falta de competência, motivação, assiduidade, comprometimento e comportamento democrático, por parte de alguns professores, resultavam em fatores comprometedores

para o aprendizado eficaz dos discentes.

4 I CONCLUSÃO

A pesquisa aponta algumas limitações, especialmente pelo fato de que não foram abordados os perfis subjetivos dos tipos de alunos que justifiquem as qualidades escolhidas para o professor ideal.

Entretanto, conclui-se que tanto atributos pessoais (ética, empatia, compreensão) quanto profissionais (comprometimento; coerência nos processos avaliativos; planejamento; didática; comunicação eficaz; atualização) estão relacionados com a expectativa dos alunos em alcançar o bom desempenho no curso.

Além disso, refletem características que os discentes almejam ser no futuro, ratificando a imagem do professor como exemplo a ser seguido em diversos âmbitos de suas vivências.

REFERÊNCIAS

ANTONELLI, R. A. *et al.* Ao Mestre com Carinho: o Bom Professor Sob a Ótica dos Discentes de Ciências Contábeis da Geração Y. **REPeC**, v. 12, n. 1, 2018.

BOWEN, M. Covid-19 has changed how we teach students. **Vet Rec**, v. 186, p. 461, 2020.

COSTA, S. M.; DURAES, S. J. A.; ABREU, M. H. N. G. Feminização do curso de odontologia da Universidade Estadual de Montes Claros. **Ciênc. saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v. 15, supl. 1, p. 1865-1873, 2010.

DAMASCENO, M. A.; COSTA, T. S.; NEGREIROS, F. Concepções de fracasso escolar: um estudo com professores das cinco regiões brasileiras. **Rev Psicol***,* v. *71, n.* 2, p. 8-21, 2016.

DAS, R. *et al.* Efficiency of mobile video sharing application (WhatsApp®) in live field image transmission for telepathology. **J Med Syst**., v. 44, n. 6, p.109, 2020.

DE-CARLI, A. D. *et al.* Integração ensino-serviço-comunidade, metodologias ativas e Sistema Único de Saúde: percepções de estudantes de Odontologia. **Cad saúde colet**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 4, p. 476-483, 2019.

EMMI, D. T. *et al.* Experiência do ensino integrado ao serviço para formação em Saúde: percepção de alunos e egressos de Odontologia. **Interface Comunic Saúde Educ**, v. 22, n. 64, p. 223-236, 2018.

FELDEN, Eliane de Lourdes. Desenvolvimento profissional docente: desafios e tensionamentos na educação superior na perspectiva de coordenadores de área. **Rev. Bras. Estud. Pedagog.**, Brasília, v. 98, n. 250, p. 747-763, 2017.

FINKLER, M. Formação ética na graduação em odontologia: realidades e desafios. 2009. 259 f. Tese (Doutorado em Odontologia) –Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2009.

FREITAS, D. A. et al. Saberes docentes sobre processo ensino aprendizagem e sua importância para a formação profissional em saúde. **Interface Comunic Saúde Educ**, v. 20, n. 57, p. 437-48, 2016.

GUIMARÃES, J. Competências do professor universitário: a prática como itinerário para a aprendizagem ativa do aluno e para a formação continuada do docente. In: Encontro da ANPAD, XXXVIII, 2014, Rio de Janeiro, Anais ... Rio de Janeiro: ANPAD, 2014.

LEAO, A. M. *et al.* Prevalência e Fatores Associados à Depressão e Ansiedade entre Estudantes Universitários da Área da Saúde de um Grande Centro Urbano do Nordeste do Brasil. **Rev. bras. educ. med.**, Brasília, v. 42, n. 4, p. 55-65, 2018.

MARDANI M. *et al.* Effectiveness of virtual patients in teaching clinical decision-making skills to dental students. **J Dent Educ**, v. 84, n. 5, p. 615-23, 2020.

MEDINA, P. F.; BEZERRA, T. O. C.; GOUVÊA, C. V. D. Fatores favorecedores e comprometedores na qualidade acadêmica do ensino de Odontologia. **Ensino Em Re-Vista**, v. 26, n. 2, 590-614, 2019.

MELLO, E. M. B.; FREITAS, D. P. S. Possibilidades formativas para os docentes universitários: compromisso institucional. **Educ. rev.**, v. 34, n. 67, p. 249-263, 2018.

MINELLA, L. S. Medicina e feminização em universidades brasileiras: o gênero nas interseções. **Rev. Estud. Fem.**, Florianópolis, v. 25, n. 3, p. 1111-1128, 2017.

PONTUAL, M.L.A. et al. Challenges in oral radiology teaching during COVID-19 pandemic. **Dentomaxillofac Radiol**, v. 20200178, 2020.

QUERINO, J. P. F. O; PEIXOTO, L. R; SAMPAIO, G. A. M. Perfil dos concluintes de odontologia da Universidade Estadual da Paraíba. Rev. Abeno, v. 18, n. 1, 2018.

QUINN, B. *et al.* COVID-19: The Immediate Response of European Academic Dental Institutions and Future Implications for Dental Education. **Eur J Dent Educ**, 2020.

RANGEL, M. Representação e reflexões sobre o bom professor. Petrópolis: Vozes, 1994.

SILVA NETO, J. M. A. et al. Processo de humanização na odontologia: uma revisão de literatura. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 60, p. e4146, 2020.

CAPÍTULO 12

NODULAÇÃO EM FEIJÃO GUANDU (*Cajanus cajan* L.) EM RESPOSTA À APLICAÇÃO DE EXTRATO DE NÓDULOS

Data de aceite: 26/05/2021
Data de submissão: 15/02/2021

Simone Yasuda Fernandes
Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Dourados, Mato Grosso do Sul
https://orcid.org/0000-0003-1418-1394

Glaucia Almeida de Morais
Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Ivinhema, Mato Grosso do Sul
http://lattes.cnpq.br/6155542247540044

Lucas Ortega Martins
Universidade Federal da Grande Dourados
Dourados, Mato Grosso do Sul
http://lattes.cnpq.br/0547225899568479

Adriana da Silva Ribeiro
Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Ivinhema, Mato Grosso do Sul
http://lattes.cnpq.br/7338759414183456

Vinicius Nunes Gomes
Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Ivinhema, Mato Grosso do Sul
http://lattes.cnpq.br/4186961325786611

Daniela Fialho Duarte
Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Dourados, Mato Grosso do Sul
http://lattes.cnpq.br/1601908332193516

Débora de Araújo
Universidade Estadual de Mato Grasso do Sul
Dourados, Mato Grosso do Sul
http://lattes.cnpq.br/2707655027351361

RESUMO: Plantas leguminosas como *Cajanus cajan* interagem com bactérias presente no solo, exercendo o processo de fixação de nitrogênio. Avaliou-se a influência do extrato à base de nódulos de *Inga vera* Willd. sobre o desenvolvimento inicial de plântulas de *Cajanus cajan*. O experimento foi inteiramente casualizado com dez repetições, em arranjo fatorial 2x10, considerando cada semente como parcela experimental. Utilizou-se 40 ml de solução por meio da maceração dos nódulos contidos nas raízes de cinco mudas de *Inga vera*. Dez sementes de *Cajanus cajan* foram embebidas em solução (T) e conservadas 10 sementes como controle (C) embebidas em água destilada, por período de 30 minutos. O experimento permaneceu 60 dias em casa de vegetação (C.V). Avaliou-se o número de nódulos (NN), o peso fresco e peso seco da região radicular, caulinar e aérea de cada planta, e o percentual de água. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância Anova: um critério com teste Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados indicaram formação de nódulos superior no controle (31,3) enquanto o tratamento apresentou média 7,3. Para o peso fresco e seco com média superior ao controle para raiz, caule e folha e peso seco e inferior para o tratamento.

PALAVRAS-CHAVE: Feijão guandu (*Cajanus cajan*); Extrato de nódulos; Fixação biológica de nitrogênio.

NODULATION IN GUANDU BEANS (*Cajanus cajan* L.) IN RESPONSE TO THE APPLICATION OF NODULES EXTRACT

ABSTRACT: Leguminous plants such as *Cajanus cajan* L. interact with bacteria present in the soil, exercising the nitrogen fixation process. The influence of the extract based on nodules of *Inga vera* Willd was evaluated. on the initial development of *Cajanus cajan* seedlings. The experiment was completely randomized with ten replications, in a 2x10 factorial arrangement, considering each seed as an experimental plot. 40 ml of solution was used by macerating the nodules contained in the roots of five Inga vera seedlings. Ten seeds of *Cajanus cajan* were soaked in solution (T) and 10 seeds were kept as control (C) soaked in distilled water, for a period of 30 minutes. The experiment remained 60 days in a greenhouse (C.V). The number of nodules (NN), the fresh weight and dry weight of the root, stem and aerial region of each plant were evaluated, and the percentage of water. The results obtained were submitted to ANOVA analysis of variance: a criterion with Tukey test at 5% probability. The results indicated formation of superior nodules in the control (31.3) while the treatment presented an average of 7.3. For fresh and dry weight with an average higher than the control for root, stem and leaf and dry and lower weight for treatment.

KEYWORDS: Pigeon pea (*Cajanus cajan*); Nodule extract; Biological nitrogen fixation**.**

1 I INTRODUÇÃO

O nitrogênio presente na atmosfera terrestre representa 78% em sua forma gasosa, constituído do isótopo N^{14} com 97% e do isótopo N^{15} com 0,3 (DELLA, 2010; *apud* JUNK; SVEC, 1958). Em um ecossistema, a entrada e reposição do nitrogênio ocorre por precipitação atmosférica, intemperismo de rochas ou decomposição de matéria orgânica, no entanto, podendo-se esgotar rapidamente (HUNGRIA; CAMPOS, 2005). Assim, existe uma escassez de nitrogênio (N2) no solo, isto torna-se um fator limitante para o crescimento de diversas plantas e para os seres vivos que dependem de compostos nitrogenados, sejam para a síntese de aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos (RAVEN, 2014).

De acordo com Raven, (2004), o ciclo do N_2 no solo ocorre primeiramente, pela quebra das substâncias nitrogenadas pela ação das bactérias, assim, as diminutas partículas em forma de aminoácidos e proteínas são absorvidas por microrganismos e excretam íons de amônio (NH_4+), esta etapa é denominada de amonificação; além disso, as bactérias realizam a oxidação da amônio á íons nitrito (NO_2-), para liberar a energia que posteriormente será utilizada para captar o dióxido de carbono, sendo caracterizado como processo de nitrificação. Porém a molécula do nitrito é tóxica para a planta, logo são oxidadas a íons nitrato, por fim podendo ser assimiladas pelas plantas (ODUM, 1988).

Sistemas agrícolas tradicionais requerem alta demanda pelo uso de fertilizantes químicos e agrotóxicos, sendo destaque para os fertilizantes nitrogenados com 70% dos custos em escala global. Tais compostos são aplicados em diversas culturas, como a cana de açúcar, soja e feijão (DOBEREINER, 1989). Sua forma molecular contém íons de amônio (NH4+) e ureia, e ao entrarem em contato com o solo, a amônio é reduzido a íons

nitrato N03, liberando energia (RAVEN, 2004).

Assim, novas tecnologias alternativas baseadas em fixação biológica de nitrogênio (FBN) no solo estão em avanço, sendo que o grupo das leguminosas são responsáveis por 60 milhões de toneladas de N fixadas ao solo (DOBEREINER, 1989). O marco histórico brasileiro, ocorreu pela arguição de compromissos a Política Nacional sobre Mudanças Climáticas pela criação da Lei N° 12.187 do ano de 2009, com o objetivo reduzir a taxa de emissão de carbono pelo setor agrícola, como resultado o uso da FBN comprova eficiência para atingir a meta de redução do CO_2 (NOGUEIRA; HUNGRIA, 2011).

Dessa forma, a decorrente associação simbiôntica entre bactérias rizóbios e plantas leguminosas, no qual resultam na formação de nódulos radiculares (RAVEN, 2004; LINCOLN; ZEIGER, 2004; DELLA, 2010). Neste processo, ambos se beneficiam, sejam as bactérias *Rhizobium* que recebem carbono e energia da planta, em troca as mesmas fornecem N orgânico para o crescimento da planta. De acordo com Teofrasto no terceiro século a.C., descreveu que os gregos utilizavam leguminosas para enriquecer o solo, esta prática na agricultura moderna conhecida como rotação de cultura, no qual plantas leguminosas como a fava (*Vicia faba*) capazes de fixar o N_2 ao solo, proporcionam maior produtividade em grãos (RAVEN, 2004; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2011).

Dentre as bactérias de rizóbio no solo, as comumente estudadas pertencem aos gêneros *Rhizobium, Sinorhizobium, Mesorhizobium, Philorhizobium, Bradyrhizobium e Azorhizobium*, que formam unidades de colônias em plantas leguminosas para iniciar o processo de nodulação (SANTOS; REIS, 2008). Assim, os nódulos radiculares são órgãos que promovem a fixação de nitrogênio, pelo armazenamento da enzima nitrogenase, inicialmente por formar o cordão infeccioso e posterior desenvolvimento do nódulo (DALLE, 2010; RAVEN, 2004). Como resultado, o processo simbiôntico ocorre devido a planta excretar substâncias flavonoides por meio dos pelos radiculares, resultando na sinalização dos genes de nodulação – Nod e moléculas da bactéria – fatores Nod (lipo-quito-oligossacarídeos) (AZEVEDO; MASSENA, 2008). Enfim, esse efeito permite ao rizóbio liberar uma sequência de genes para o desenvolvimento do cordão de infecção, à medida que o nódulo se desenvolve, novos compostos são necessários, como polissacarídeos de superfície, carboidratos e proteínas (RAVEN, 2004; BROUGHTON et al., 2006).

Ainda mais, a unidade formadora de colônia (UFC) do rizóbio ao pelo radicular é iniciado pela expressão da proteína ricadesina (Ca^{+2}), no qual comete uma ligação fraca entre ambos, em segunda etapa ocorre uma ligação forte, as bactérias sintetizam celulose e fibrilas para fixarem a membrana da raiz hospedeira e prosseguirem divisão celular (GAGE, 2004), como descrito na literatura para R. leguminosarum. Durante o desenvolvimento do cordão de infecção, existe uma associação entre a ponta e o núcleo do pelo radicular (GAGE, 2004). Além disso, a entrada do N_2 pela ação da bactéria, funciona em virtude da capacidade de reduzir o N2 atmosférico á amônia, contudo, sua composição torna-se tóxica a planta, em resolução a amônia é rapidamente convertida a amidas ou ureídos logo

nutrindo as plantas-hospedeiras (LINCOLN; ZEIGER, 2004).

Dentre os nutrientes essenciais para a formação de aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos, o nitrogênio se destaca como componente de proteínas e coenzimas que são destinados à nutrição da planta. Este nutriente está presente na atmosfera terrestre constituindo 78% em forma gasosa, entretanto, existe uma escassez de nitrogênio no solo, isto torna-se um fator limitante para o crescimento das plantas e para os seres vivos obterem os compostos nitrogenados (RAVEN, 2014). Em um ecossistema, a entrada e reposição de nitrogênio podem ocorrer em quantidade menor por precipitação atmosférica, intemperismo de rochas ou transferidas por meio de organismos mortos, mas em termos de quantidade total de fixação de nitrogênio (FBN) no solo, a simbiose por bactérias rizobias e plantas leguminosas é o processo mais eficiente. O processo de FBN requer a captura de N2 atmosférico reduzida a NH4+ pela ação de bactérias rizobias que catalisam o nitrogênio através da enzima nitrogenase, sendo constituída de prostéticos de molibdênio, sulfato e ferro que são essenciais para reação biológica. (RAVEN, 2014)

A associação entre bactéria *Rhizobium* ou Bradyrhizobium capaz de induzir a formação de nódulos radiculares em plantas leguminosas para a fixação de nitrogênio no solo, torna-se uma interação benéfica entre as bactérias que fornecem nitrogênio para formação de aminoácidos em leguminosas e as plantas retribuem fornecendo moléculas de carbono que são utilizadas como fonte de energia pelas bactérias. Portanto, a formação de nódulos no sistema radicular inicia-se pelo processo infeccioso para a entrada de rizóbios e posterior formação de nódulos, fornecendo um ambiente favorável para a nitrogenase. (RAVEN, 2014). Os pelos radiculares excretam uma sequência de proteínas flavonoides (nodD lipo-quito-oligossacarídeo) que ativam genes reguladores de formação de nódulos (NOD), assim, as bactérias rizobias disponíveis no solo ativam as proteínas NOD das raízes que enviam os genes para a formação do nódulo radicular (PERRET,2000; RAVEN,2014). A fase da transcrição enzimática da simbiose conduz a uma variação de sequências do gene radicular, incluindo carboidratos ao início da divisão celular, enquanto que uma camada de polissacarídeo recubra à superfície celular do rizóbio permitindo o desenvolvimento do cordão de infecção, possibilitando que a bactéria penetre nas raízes de leguminosas (TRAMNIN, 2001).

Segundo Trindade (2000); Raven (2014), a concentração de O_2 nas células de plantas infectadas por rizóbios devem ser reguladas devido o O_2 ser um inibidor da enzima nitrogenase. Para resolução da situação, a presença da proteína leg-hemoglobina em vegetais é responsável por se ligar e transportar a molécula de oxigênio para as células radiculares e a formação de um local com a cor rosada na região central do nódulo é produzida pelo bacteroide em sua porção heme e pela planta em sua parte globina (BRANDELERO, 2009).

De acordo com Thies et al. (1999) a população de rizóbios nativos do solo é específico ao atender à fixação de N_2 da planta, existem características fisiológicas encontrada em

diferentes gêneros de *Rhizobium*, como a produção de melanina produzida pela oxidação de composto fenólicos (JACOBSON, 2000). Este pigmento de melanina está sendo utilizado em pesquisas para caracterizar rizóbios nativos de feijão e soja (ANDRADE, 2002).

O feião guandu (*CajanUs cajan)* apresenta alto valor nutritivo, sendo rico em proteínas e por ser uma leguminosa com alta capacidade de fixação de nitrogênio ao solo, é utilizada como pioneira em solos degradados ou relativamente pobres em nutrientes (LEAL, 2008). Esta espécie de leguminosa vem sendo amplamente estudada para extração de nódulos de raízes para produção de bioestimulante natural e comparado com o biestimulante comercial, em seus efeitos de FBN (DOBEREINER, 2013).

Assim, a expectativa é que a exposição de sementes a extratos obtidos a partir de nódulos ativos, contendo bactérias fixadoras de nitrogênio, possa estimular ou acelerar o processo de nodulação e, consequentemente, a fixação, mas o uso de extratos obtidos de espécies vegetais distintas pode não ter este efeito.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta de nodulação em plantas de *Cajanus cajan* à aplicação de extrato à base de nódulos de *Inga vera* diretamente nas sementes e nas plantas cultivadas em casa de vegetação.

2 I MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em casa de vegetação na UEMS, localizado no município de Ivinhema - M.S. Adotou-se o delineamento experimental casualizado com vinte repetições para o controle e tratamento com a cultivar de feijão guandu (*Cajanus cajan* L.).

As sementes de feijão guandu (*Cajanus cajan L.*) foram adquiridas em uma pequena propriedade no centro do município de Ivinhema – MS. A montagem do experimento foi realizada no laboratório de química da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, no mês de agosto de 2018. Primeiramente, foram coletadas cinco mudas de *Inga vera L.* do viveiro de mudas nativas do PET (Programa Educacional Tutorial), após a lavagem em água corrente, foram retirados os nódulos radiculares e lavados com água em abundância. Os nódulos encontrados possuem variação de tamanho entre 0,5 a 3,0 cm de comprimento, totalizando 4,00 gramas (g) de massa fresca total, com 1 g para cada planta (Figura 01).

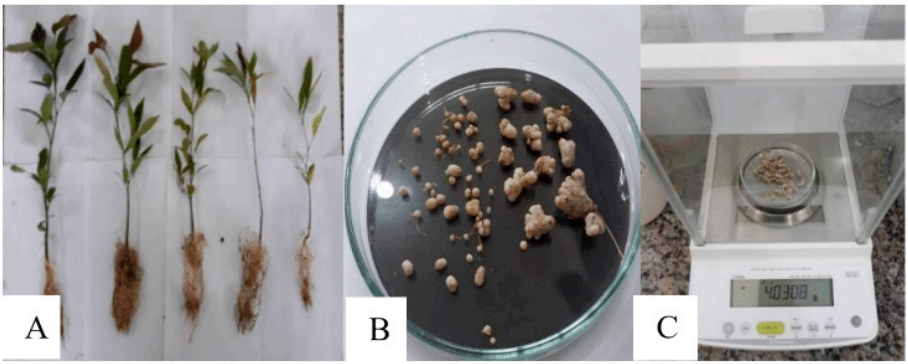


Figura 01 – Extração de nódulos de *Ingá edulis*: A - Preparação das mudas de *Inga edulis* para extração de nódulos. B - Nódulos extraídos das raízes. C – Massa fresca total de nódulos radiculares de *Inga vera*.

Fonte: Fernandes (2018).

Após a pesagem, os nódulos foram cortados e macerados em almofariz, com adição de 10 ml de água destilada inicialmente, seguindo-se pela adição de mais água gradativamente até atingir-se uma solução de 40 ml de extrato de nódulo de *Inga vera*. Posteriormente a solução foi filtrada e armazenada em erlenmeyer de 50 ml previamente esterilizada, com auxílio de tela de tecido branca sobreposta em funil (Figura 02).

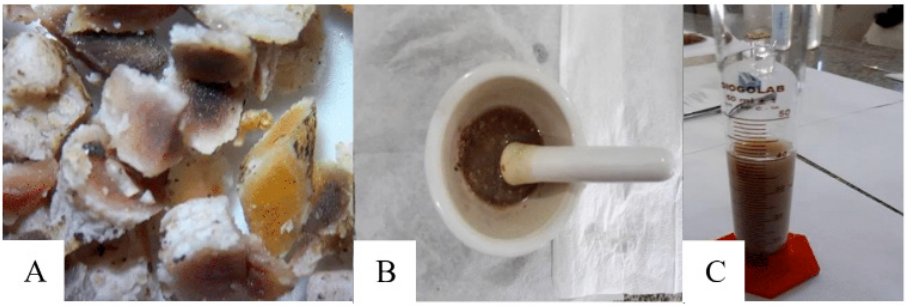


Figura 02 - Trituração de nódulos extraídos de *Ingá edulis*: A – Nódulos cortados. B – Almofariz contendo extratos de nódulos para maceração. C – Solução de nódulos de *Inga edulis* (40 ml).

Autor: Fernandes (2018).

Foram utilizadas total de 40 sementes de feijão guandu, sendo 20 sementes embebidas no extrato de nódulos (tratadas) e para homogeneizar a solução foram misturadas com auxílio de bastão de vidro ao longo do tempo, e 20 sementes embebidas em água destilada (controle), durante 10 minutos. Posteriormente, as sementes dos seus respectivos tratamento e controle foram transferidas para placa de petri contendo uma folha de papel filtro, no qual seguiram para o plantio. As sementes foram semeadas em tubetes contendo vermiculita como substrato. Foram utilizados 20 tubetes, sendo 10 tubetes para

o controle e 10 tubetes para o tratamento, cada um recebendo duas sementes dispostas a uma profundidade de aproximadamente 3 cm.

Para o tratamento foi aplicada 1 ml da solução de nódulos por tubete, sendo 10 ml por semana, totalizando quatro aplicações em quatro semanas.

O experimento foi conduzido na área protegida do viveiro, permanecendo sob sombreamento artificial a 50% (sombrite) no viveiro da UEMS, unidade de Ivinhema, com irrigação automática por aspersão cinco vezes ao dia durante cinco minutos.

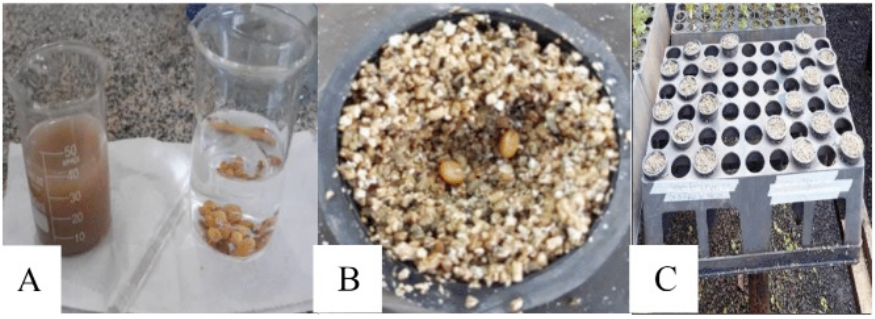


Figura 03 - Imersão de sementes e plantio: A – Imersão de sementes no tratamento e controle. B – Plantio de sementes em tubetes preenchido com vermiculita. C – Experimento no viveiro da UEMS.

Autor: Fernandes (2018).

A nodulação foi avaliada a partir da remoção das plantas aos 60 dias após a emergência. As plantas foram retiradas dos tubetes e lavadas em água corrente, até a total retirada do substrato, posteriormente ocorreu a separação de nódulos e contagem total de nódulos por planta da raiz. Posteriormente foram separadas a raiz, caule e folha das plantas de feijão guandu para a pesagem em balança analítica (0,0000 g) a fim de obter o peso fresco; imediatamente após, postas em papel Kraft com a identificação da data, número da muda, se ela pertencia ao grupo T ou C. Elas foram mantidas em estufa, com temperatura ajustada a 60° C por 48 horas, após foram novamente pesadas em balança analítica para obter o peso seco. As duas variáveis obtidas, permitiram analisar a massa seca e percentual de água por planta. As variáveis analisadas foram: peso fresco e seco das raízes, caules, folhas e nódulos, além do número de nódulos por planta, em ambos, tratamento e controle, também foi realizado a medição do comprimento

Os dados foram submetidos à análise de variância anova (um critério) para analisar a normalidade, teste Tukey a 5% de probabilidade para comparar a produtividade das plantas, com auxílio do programa BioEstat 5.0.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nódulos

Em relação ao número de nódulos o controle apresentou média de 31,3 g nódulos, com maior nodulação em relação ao tratamento que teve 7,3 g (tabela 1), com o teste de Tukey a 5% os valores de Q=10,68 e p<0,01 mostraram diferença significante. Também nas médias da massa fresca e seca o controle mostrou-se superior, sendo 0,027 g massa fresca e 0,0205 a massa seca, enquanto o tratamento foi 0,013 g massa fresca e 0,0098 g massa seca (tabela 1), no teste de Tukey da massa fresca temos Q=0,28 e p<0,01; e no peso seco Q=6,73 e p<0,01.

Média de 10 plantas	N° Nódulos (g)	Massa fresca (g)	Massa seca (g)
Controle (C)	31,3 a	0,027 a	0,020 a
Tratamento (T)	7,3 b	0,013 b	0,008 b

Médias acompanhadas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (p>0,05).

Tabela 1: Comparação da média do número de nódulos, massa fresca e massa seca em relação ao controle e tratamento de plantas de *Cajanus cajan* L.

Os percentuais de H_20 e de massa seca dos nódulos foram respectivamente 27,3% e 72,7% no controle, e 24,9%; 75,1% no tratamento. O comparativo do controle com o tratamento não apresentou diferença significativa com p=0,6799 e p=0,99 respectivamente. Os valores foram, H_20 com 47,4% no controle e 27,8% no tratamento, e massa seca 52,6% no controle e 72,2% no tratamento.

Raiz

Em relação ao desenvolvimento radicular, a média da massa fresca foi: em controle 0,55 g e no tratamento 0,18 g (tabela 2) enquanto a massa seca foi: em controle 0,22g e no tratamento 0,13g (tabela 5). No teste de Tukey a 5% ambos se mostraram significantes, a massa fresca teve valores de Q=3,9 e p<0,05 e o peso seco Q=5,52 e p<0,01. Novamente a diferença de porcentagem de H_20 e massa seca não foi significativa, p=0,066 e p=0,066 respectivamente.

Média de 10 plantas	Massa fresca (g)	Massa seca (g)
Controle (C)	165,7 a	0,222 a
Tratamento (T)	0,181 b	0,139 b

Médias acompanhadas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (p>0,05).

Tabela 2: Comparação da massa fresca e massa seca de raízes de plantas do controle e tratamento de *Cajanus cajan* L, expresso em gramas (g).

Caule

No caule (sem folhas) a média da massa fresca do controle foi 0,31g enquanto o tratamento foi 0,2g (tabela 3), enquanto a média da massa seca foi de 0,11g no controle e 0,08g no tratamento (tabela 3). Com o teste de Tukey a 5% ambos demonstraram significância, tendo valores de Q=5,8 e p<0,01 para o peso fresco e Q=4,05 e p<0,05 para a massa seca.

Média de 10 plantas	Massa fresca (g)	Massa seca (g)
Controle (C)	0,311 a	0,117 a
Tratamento (T)	0,207 b	0,089 b

Médias acompanhadas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (p>0,05).

Tabela 3: Comparação da massa fresca e massa seca do caule de plantas do controle e tratamento de *Cajanus cajan* L, expresso em gramas (g).

A porcentagem de H_20 e de massa seca no caule foram respectivamente 63,1% e 37,5% para o controle e 57,3%, 43,7% para o tratamento, e no teste apresentaram Q=10,2 e p<0,01 a %H_20 e Q=8,87 e p<0,01 a massa seca, sendo significativa a diferença.

Folha

As folhas tiveram massa fresca, a média de 0,7 g no controle e 0,38 g no tratamento (tabela 4), enquanto que o peso seco foi de 0,25g no controle 0,16g no tratamento(tabela 9), e no teste de Tukey a 5% apresentou Q= 8,5 e p<0,01 para peso fresco e Q=5,9 e p<0,01, sendo a diferença entre esses significativas.

Média de 10 plantas	Massa fresca (g)	Massa seca (g)
Controle (C)	0,701 a	0,258 a
Tratamento (T)	0,381 b	0,166 b

Médias acompanhadas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (p>0,05).

Tabela 4: Comparação da massa fresca e massa seca de folhas de plantas do controle e tratamento de *Cajanus cajan* L, expresso em gramas (g).

A porcentagem de H_20 nas folhas foi de 63,7% no controle e 56,5% no tratamento, enquanto a massa seca foi de 36,3% no controle e 43,5% no tratamento, mas a diferença foi não significativa sendo p=0,066 em % H_20 e p=0,076 na massa seca.

4 I DISCUSSÃO

Pelos dados obtidos, o tratamento de extrato de nódulos do *Inga vera* foi prejudicial ao desenvolvimento do feijão guandu em todos os aspectos, tanto na quantidade de

nódulos, quanto no peso fresco e seco dos mesmos, assim como no desenvolvimento radicular e aéreo, aonde novamente o controle (que estava sem tratamento adicional) foi superior ao tratamento com extrato. O resultado foi contrário ao esperado.

Sousa (2007), descreveram a utilização de inoculantes com bactérias fixadoras para feijão-caupi, e seus resultados demonstram o potencial da utilização de nodulação como adubo verde. Não obstante os dados de Fernandes, Fernandes e Hungria (2003) demonstram que a média de número de nódulos do controle de feijão guandu foi 7,19 enquanto a do tratamento com inoculante Rizóbio foi 29,5. E na realização do teste de Tukey a 5% eles tiveram aumento significativo nos valores de: variância da massa da parte aérea seca, da área foliar, massa de nódulos secos, número de nódulos, e do N total acumulado nas folhas, para o tratamento com inoculante Rizóbio.

Oliveira e Sbardelotto (2011), tiveram os mesmos prognósticos para sua pesquisa com diferentes variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris* L) inoculados com *Rhizobium tropici,* todos seus resultados foram positivamente significativos para a inoculação de *R. tropici* com números de formação de nódulos como 14 para 73 entre controle e tratamento da variedade "Pontal" (a de maior destaque em diferença, e 24 para 34 numero de nódulos entre controle e tratamento entre a variedade "Horizonte" (a de menor diferença).

Os trabalhos de Souza (2007) e Olivera e Sbardelotto (2011), foram ambos com plantio em terra de latossolo vermelho argiloso, o que pode ter sido um dos parâmetros para a diferença de dados.

Souza (2014) analisou diferentes concentrações de tratamentos para os mesmos estirpes, e observou que em certas diversidades, o tratamento até 10^{-5} de diluição de um certo Rízobio tinha eficácia (positivamente significativo) em relação ao controle, entretanto o mesmo Rízobio à uma diluição de 10^{-7} era negativamente significante, diminuindo a taxa de crescimento do feijão (*P. vulgaris* L.). De dez tratamentos com diferentes estirpes diferentes, 3 apresentaram tal resultado.

Outro fator determinante ao que indica é o Ph do solo, segundo Almeida *et al.* (2013), que caracterizou colônias das bactérias diazotróficas de estirpes provenientes de *Inga edulis*, após a inoculação, as bactérias alteraram o Ph do meio para ácido, e tiveram crescimento lento, depois de 7 dias com 1mm de diâmetro, e após 14 dias com uma media de 4,12mm de diâmetro. Caso as bactérias do extrato de *Inga vera*, também apresentem tal comportamento (acidificar o meio, e de crescimento lento), sanaria a questão sobre o tratamento estar com menor desenvolvimento, pois a acides afetaria a CDC, e portanto os nutrientes disponíveis ao feijão guandu.

Outro ponto dito por Fernandes, Fernandes e Hungria (2003) em seu trabalho que podemos levantar para compreender nossos resultados é que, as estirpes nativas, diferentes de outras como as próprias do feijão guandu ou caupi, não são tão selecionadas ao cultivo quanto. Como aponta Marchetti, Santos e Baratto (2017), que o *Inga vera*, em sua condição normal de desenvolvimento (Ph 4 ácido), e no inverno pode ter uma variedade

de até 8 tipos de bactérias, enquanto que no verão 2 (sendo incomum uma planta ter maior variedade de mutualistas no inverno), elas descrevem quais são eles e Bradyrhizobium, 08 (ci38); 10 (ci40) e 52 (cv89) são descritos em trabalhos como de Araujo e Hungria (1999) na inoculação em feijão e soja, que não apresentam diferença significativa do controle para o tratamento. Enquanto que as estirpes indicadas para feijão guandu seriam Bradyrhizobium R43 e R45 (FERNANDES, FERNANDES, HUNGRIA. 2003).

No trabalho de Silva (2016), foi possível observar que a aplicação de inoculante alternativo de extrato de nódulos do proprio feijão caupi, na mesma espécie, proporcionou número de nódulo de 50, demonstrando diferença significante ao inoculante comercial com 39 nódulos, apontando que por mais que existem várias alternativas aos inoculante como estirpes comerciais, as estirpes nativas de cada espécie aparentam ser as mais indicadas, por já coexistirem na natureza , enquanto que certos feijões como o caupi e guandu não estariam aclimatados suficientemente a utilização de tais estirpes. Resultado também obtido por Junior (2010), que também averiguo que estirpes como BR 3267, 3301 e 3302 não apresentam diferença significativa ao controle.

Por outro lado Pinheiro, et al, (2016) em seu trabalho relatou que o tratamento nitrogenado com extrato de nódulos em feijão caupi, pode ter causado alguma desordem fisiológica nas plantas, relata resultados com média de número de nódulos de 9,50 para controle e 9,50 e para o tratamento 3,16.

Feijão guandu direto no latossolo vermelho pode ter dificuldade na produção de nódulos mas nas condições do viveiro, com substrato comercial e adubação de sulfato de amônia e NPK e em tubetes estriados, apresentaram nodulação maior que, os com tratamento de extrato de nódulos da raiz de *Inga vera*, que pode ser compreendido como que os nódulos nativos do feijão guandu são mais indicados aos de *I. vera*. Aconselha-se novas repetições afim de confirmar o resultados, e com diferentes solos, e maior controle do Ph, e com diferentes concentrações dos extratos, e com extratos de mais espécies, até mesmo com o próprio extrato do guandu. E também saber quais bactérias, como por exemplo no do *I. vera,* que apresenta uma diversidade de até 10 bactérias fixadoras diferentes, quais estão se sobressaindo no feijão guandu, para sabermos exatamente qual estirpe está causando os efeitos mensurados.

5 I CONCLUSÃO

Conclui-se que o tratamento de extrato de nódulos do *Inga vera* foi prejudicial ao desenvolvimento do feijão guandu (*Cajanus cajan*) em todos os aspectos, tanto na quantidade de nódulos, quanto no peso fresco e seco, assim como no desenvolvimento radicular e aéreo, aonde novamente o controle (que estava sem tratamento adicional) foi superior ao tratamento com extrato. O resultado foi contrário ao esperado.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, G. S; NASCIMENTO, L. O; ALMEIDA, A. D. S; CARDOSO, J. F; LEAL, F. A. **Capacidade de nodulação em Inga sp. de ocorrência na Amazônia Ocidental**. Enciclopédia Biosfera, v. 9, p. 491-508, 2013.

ARAÚJO, F. F. de; HUNGRIA, M. **Nodulação e rendimento de soja co-infectada com Bacillus subtilis e Bradyrhizobium japonicum/Bradyrhizobium elkanii**. Pesquisa agropecuária brasileira, v. 34, n. 9, p. 1633-1643, 1999.

ANDRADE,D.S; MURPHY,P.J; GILLER, K.E. **A diversidade dePhaseoluspopulações nodulares rizobiais é altevermelho pela calagem de solos ácidos plantados com Phaseolis vulgaris L. no Brasil**. Aplicado e Ambiental Microbiologia Washington, v.68, n.8, p. 4025-4034, 2002.

FERNANDES, M. F; FERNANDES, R. P. M; HUNGRIA, M. **Seleção de rizóbios nativos para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 38, n. 7, p. 835-842, 2003.

JACOBSON, E.S. **Patogênico roles para melanias fúngicas**.Clínico Microbiologia Comentários, v.13, n.4, p.708-717, 2000.

JUNIOR, A. F. C; Rahmeier, W; Fidelis, R. R; dos Santos, G. R; Chagas, L. F. B. **Eficiência agronômica de estirpes de rizóbio inoculadas em feijão-caupi no Cerrado, Gurupi-TO**. Revista Ciência Agronômica, v. 41, n. 4, p. 709-714, 2010.

MARCHETTI, M.M; SANTOS, J. C. P; BARATTO, C. M. **Caracterização de bactérias em nódulos de leguminosas arbóreas de fragmentos da floresta ombrófila mista**. Scientia agraria, v. 18, n. 4, p. 50-62, 2017.

OLIVEIRA, R. S de; SBARDELOTTO, J. M. **Nodulação em diferentes variedades de feijão inoculadas com Rhizobium tropici**. Cultivando o Saber, Cascavel, v. 4, n. 2, p. 46-52, 2011.

RAMALHO, I. O. **Avaliação do feijoeiro (Phaseolus vulgaris) submetido à inoculação com extrato de nódulos**. Anais da Semana Científica Johanna Döbereiner, 2013.

]

SANTOS, L. A.; REIS, VMA**. A formação do nódulo em leguminosas**. Embrapa Agrobiologia-Documentos (INFOTECA-E), 2008.

SILVA JÚNIOR, E. B. da; SILVA, K; OLIVEIRA, S. S; OLIVEIRA, P. J. de; BODDEY, R. M; ZILLI, J. É; XAVIER, G. R. **Nodulação e produção de feijão-caupi em resposta à inoculação com diferentes densidades rizobianas**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 49, n. 10, p. 804-812, 2014.

SOUSA, P. M. **Potencial do uso da inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio: Alternativa para aumentar a produtividade do feijão-caupi na agricultura familiar de Confresa**, Mato Grosso. 2007.

SOUZA, E. M. de. **Avaliação dos efeitos da inoculação de estirpes de rizóbios nativos do Vale do Taquari em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso.

PINHEIRO, M. S, *et al.* **Efeito do extrato de nódulos sobre o crescimento do feijão-caupi em casa de vegetação**. CONDIGIS CONGRESSO INTERNACIONAL DA DIVERSIDADE DO SEMIÁRIDO. 2016.

CAPÍTULO 13

OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA A EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO EM *Physalis* L.

Data de aceite: 26/05/2021
Data de submissão: 15/04/2021

André Pinto Lima
Universidade Estadual de Feira de Santana
UEF
Feira de Santana/ BA
http://lattes.cnpq.br/0936262594957535

Hortência Kardec da Silva
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP/ FCAV
Jaboticabal/ SP
http://lattes.cnpq.br/1799010022139668

Rafael Cruz Cordeiro
Universidade Estadual de Feira de Santana
UEFS
Feira de Santana/ BA
http://lattes.cnpq.br/7721659681443269

Maryelle Vanilla de Abreu Cerqueira
Universidade Estadual de Feira de Santana
UEFS
Feira de Santana/ BA
http://lattes.cnpq.br/6990074943266553

Jéssica Barros Andrade
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP/ FCAV
Jaboticabal/ SP
http://lattes.cnpq.br/6879852317728443

Aparecida Gomes Feitosa
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP/ FCAV
Jaboticabal/ SP
http://lattes.cnpq.br/9300599548604196

Joseane Inácio da Silva Moraes
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA/ MN
Teresina/PI
http://lattes.cnpq.br/0035369080655781

RESUMO: As espécies, pertencentes ao gênero *Physalis* L., são importantes porque fornecem frutos comestíveis e uma grande diversidade de bio-produtos, que têm um amplo espectro de atividades biológicas. Diante da importância da cultura tornam-se necessários estudos moleculares para analisar a diversidade genética. A obtenção de DNA de boa qualidade é pré-requisito fundamental para o sucesso em análises moleculares. Nesse contexto, o trabalho proposto tem por objetivo testar protocolos de extração de DNA e estabelecer o que apresente uma maior quantidade e qualidade de DNA genômico de *Physalis*, para fins de análise de divergência genética via marcadores moleculares. Foram testados dois protocolos para extração de DNA, o proposto por Doyle e Doyle (1990) e Santos et al. (2014). A verificação da qualidade e quantidade do DNA foi realizada através de eletroforese em gel de agarose a 0,8%, as amostras foram coradas com GelRed, e a eletroforeses a uma voltagem igual a 60W por 1hora. As amostras foram visualizadas através

do sistema de fotodocumentação e a quantificação do DNA foi realizada por comparação com o DNA Fago lambda de concentração conhecida. Ao analisar a integridade do DNA extraído com o protocolo proposto por Doyle e Doyle (1990) se mostrou insatisfatório para a extração de DNA de *Physalis* L. O protocolo 2 , Santos et al. (2014), produziu DNA de boa qualidade para todas as formas de armazenamento do material vegetal testadas para *Physalis* L., não havendo contaminação e degradação. O tampão com o CTAB na concentração de 10% foi eficiente para a extração de DNA no protocolo 2 quando comparado com o tampão de extração de concentração de 5% de CTAB do protocolo 1. Entre os dois protocolos testados neste trabalho tendo como base o método CTAB o que apresentou melhor resultado foi o de Santos et al (2014). A aplicação de CTAB na concentração de 10% foi mais efetivo no isolamento de DNA para *physalis* L. Sendo assim, o Protocolo 2 (Santos et al.,2014) é o mais indicado para trabalhos com extração de DNA de *Physalis* L.
PALAVRAS-CHAVE: Quantificação de DNA, Variabilidade genética, Biotecnologia.

OPTIMIZATION OF PROTOCOLS FOR THE EXTRACTION OF GENOMIC DNA IN *Physalis* L.

ABSTRACT: The species, belonging to the genus Physalis L., are important because they provide edible fruits and a great diversity of bio-products, which have a wide spectrum of biological activities. Given the importance of culture, molecular studies are needed to analyze genetic diversity. Obtaining good quality DNA is a fundamental prerequisite for successful molecular analysis. In this context, the proposed work aims to test protocols for DNA extraction and to establish what presents a greater quantity and quality of Physalis genomic DNA, for the purpose of analyzing genetic divergence via molecular markers. Two protocols for DNA extraction were tested, the one proposed by Doyle and Doyle (1990) and Santos et al. (2014). DNA quality and quantity verification was performed using electrophoresis on 0.8% agarose gel, as they were stained with GelRed, and electrophoresis at a voltage equal to 60W for 1 hour. The samples were visualized through the photo-documentation system and the quantification of the DNA was performed by comparison with the DNA Phage lambda of known concentration. When analyzing the integrity of the extracted DNA with the protocol proposed by Doyle and Doyle (1990), it was unsatisfactory for the DNA extraction of Physalis L. Protocol 2, Santos et al. (2014), produced good quality DNA for all forms of storage of plant material tested for Physalis L., with no contamination and degradation. The buffer with the CTAB at a concentration of 10% was efficient for the extraction of DNA in protocol 2 when compared with the buffer of concentration of 5% of CTAB of protocol 1. Among the two protocols tested in this work based on the method CTAB that presented the best result was that of Santos et al (2014). The application of CTAB at a concentration of 10% was more effective in isolating DNA for physalis L. Therefore, Protocol 2 (Santos et al., 2014) is the most suitable for works with DNA extraction from Physalis L.
KEYWORDS: DNA quantification, Genetic variability, Biotechnology.

INTRODUÇÃO

O gênero *Physalis* L., pertence à família das solanáceas, e corresponde a um grupo com espécies economicamente importantes como o tomate (*Lycopersicon esculentum*

Mill.) e a batata (*Solanum tuberosum L.).* O gênero apresenta uma morfologia característica durante o estádio de frutificação, em que o fruto se desenvolve dentro de um cálice acrescente e inflado (RUFATO et al., 2012).

As espécies, pertencentes ao gênero, são importantes porque fornecem frutos comestíveis e uma grande diversidade de bio-produtos, que têm um amplo espectro de atividades biológicas. Além disso, vários estudos têm evidenciado o potencial antibactericida e antitumoral de compostos secundários de diferentes espécies do gênero (KENNELLY et al., 1997; HSIEH et al., 2006), sendo que as espécies tem um grande valor nutricional e econômico.

Diante da importância da cultura tornam-se necessários estudos moleculares para analisar a diversidade genética, pois a quantificação da variabilidade genética auxilia no planejamento de estratégias mais eficazes que venham a maximizar a utilização dos recursos genéticos com vista a sua conservação (SILVA, 2014).

Os estudos através de marcadores moleculares de DNA podem ser divididos em três grupos: os baseados em hibridizações, os baseados na Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e por último, os baseados em sequenciamento (ZOLET, 2017). As técnicas que utilizam PCR dependem diretamente da qualidade e quantidade adequada do DNA extraído (BUENO, 2004). Dessa forma, a obtenção de DNA de boa qualidade é pré-requisito fundamental para o sucesso em análises moleculares (ARBI et al., 2010).

A presença de agentes contaminantes como polissacarídeos, fenóis e compostos secundários correspondem ao principal problema na obtenção de DNA vegetal puro, porque estes afetam a ação da enzima Taq DNA polimerase (OLIVEIRA et al., 2010). Assim, é necessário que diversos protocolos de extração de DNA devam ser testados para cada espécie vegetal, a fim de obter DNA de alta qualidade e em quantidade adequada (OLIVEIRA et al., 2007).

Nesse contexto, o trabalho proposto tem por objetivo testar protocolos de extração de DNA e estabelecer o que apresente uma maior quantidade e qualidade de DNA genômico de *Physalis*, para fins de análise de divergência genética via marcadores moleculares.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Genética Molecular (LAGEM) da Unidade Experimental Horto Florestal, pertencente à Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). As sementes de fisalis foram semeadas em casa de vegetação e transplantadas com aproximadamente 40 dias para campo com adubação adequada. Para a extração do DNA, folhas jovens foram coletadas, lavadas com água destilada para desinfecção e posteriormente secas. Foram testados dois protocolos de extração de DNA.

Teste de Protocolos e Métodos de Extração - Foram testados dois protocolos para extração de DNA, o proposto por Doyle e Doyle (1990) e Santos et al. (2014). Foram

testados métodos de maceração com nitrogênio líquido, maceração direta no tampão de extração e maceração em areia na presença do tampão de extração. Ainda, serão realizados testes a fim de determinar a melhor forma de armazenamento do material vegetal, sendo utilizadas amostras do material vegetal fresco, armazenado em freezer e em sílica gel.

Protocolo 1. Doyle e Doyle (1990) - Cerca de 300 mg de tecido foliar fresco foram pulverizados em cadinhos de porcelana com nitrogênio líquido e transferidos para tubos de microcentrífuga de 2 mL. Foram adicionados ao material 800 μL de tampão de extração (2% CTAB; 1,3 M NaCl; 0,2% 2-β-mercaptoetanol; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl pH 8; 1% PVP 40). Incubou-se a 70°C por 60 minutos, invertendo os tubos, suavemente, a cada 10 minutos. Após deixar esfriar à temperatura ambiente por 5 minutos, foi realizada a desproteinização, adicionando-se 700 μL de clorofórmio-álcool isoamílico. Em seguida, as amostras foram agitadas, por suaves inversões, por 10 minutos e centrifugadas a 4°C, a 18,845 g, por 10 minutos. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para tubos de 2 mL, foram adicionados 55 μL de CTAB 2%, e o processo de desproteinização foi repetido, acrescentando-se o mesmo volume de clorofórmio-álcool isoamílico. Para a precipitação do DNA, foram adicionados ao sobrenadante 700 μL de isopropanol gelado. Os tubos foram mantidos a -20°C por duas horas e, a seguir, centrifugados como anteriormente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70% e seco em temperatura ambiente, por aproximadamente 60 minutos. Posteriormente, os ácidos nucleicos totais foram ressuspendidos em 150 μL de água contendo RNAse na concentração de 40 μg/mL e colocados em banho-maria, a 37°C por 60 minutos, para a completa ressuspensão do DNA e digestão do RNA. Após esse período, o DNA foi novamente precipitado, centrifugado e ressuspendido em 150 μL de água como já descrito. A conservação do DNA extraído foi feita a -20°C.

Protocolo 2. Santos et al. (2014) - Cerca de 0,3 gramas foram macerados de tecido vegetal com 3 ml de tampão de extração (CTAB 10%; NaCl 5M; Tris-HCl 1M pH 8,0; EDTA 0,5M; Na Sulfite, PVP (Polivinilpirrolidona) e água mili-Q - mantido a 65°C) em um saco plástico. Assim transferidos 2 ml do macerado para tubos de 2 ml, sendo misturados por inversão e incubados por 30 minutos em banho-maria a 65°C, agitando a cada 10 minutos. Ao atingir o tempo, os tubos foram centrifugados a 10000 RPM a temperatura ambiente por 5 minutos, o sobrenadante foi transferido para novos tubos de 2 ml. Foram adicionados 800 µL de álcool Isoamilico e misturado por inversão. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10000 RPM a temperatura ambiente. Após coletado o sobrenadante ouve a transferência para novos tubos de 1,5 ml. Adicionando 600 µL de álcool Isopropilico (gelado), equivalente a aproximadamente a 2/3 do volume coletado, sendo homogeneizado suavemente e incubado a -20°C por 30 minutos. Foram centrifugados a 10000 RPM a 4°C por 10 minutos e o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70%, assim deixando secar o pellet formado. O DNA isolado foi ressuspendido em 30 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0 e EDTA 1 mM), (RNAse – 1 µL amostra) e as amostras foram colocadas na

estufa a 37°C para a completa solubilização de DNA, por 30 minutos. O DNA concentrado foi conservado a -20°C.

Avaliação do DNA obtido - Após a extração do material genético, foi realizada a diluição do DNA com o uso de TE gelado. Em seguida, realizou a verificação da qualidade e quantidade do DNA através de eletroforese em gel de agarose a 0,8%, as amostras foram coradas com GelRed, e a eletroforeses a uma voltagem igual a 60W por 1hora. As amostras foram visualizadas através do sistema de fotodocumentação. A quantificação do DNA foi realizada por comparação com o DNA Fago lambda de concentração conhecida. Após quantificação, as amostras tiveram a sua concentração ajustada para 5ng/µL por diluição em tampão TE e foram verificadas, novamente, por eletroforese em gel de agarose a 1% sob as condições especificadas acima.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao visualizar o perfil eletroforético das amostras foi possível verificar que apenas um dos protocolos testados foi eficiente para isolamento de DNA de *Physalis* L. em quantidade adequada para estudos moleculares, tendo sido detectadas diferenças nos dois protocolos utilizados. Ao analisar a integridade do DNA extraído com o protocolo proposto por Doyle e Doyle (1990) se mostrou insatisfatório para a extração de DNA de *Physalis* L, apresentando um material fraco e não uniforme, tanto em relação à quantidade quanto à qualidade do DNA isolado, uma vez que este se apresentou totalmente danificado em todas as amostras (Figura 1).

Figura 1: Analise Eletroforética do DNA genômico de *Physalis* L. utilizando o protocolo de Extração do DNA, Doyle e Doyle (1990). Amostras aplicadas com volume de 5µL. Amostras de genótipos da Unidade Experimental Horto Florestal.

O protocolo 2 , Santos et al. (2014), produziu DNA de boa qualidade para todas as formas de armazenamento do material vegetal testadas (material vegetal fresco, armazenado em freezer e em sílica gel) para *Physalis* L., não havendo contaminação e degradação (Figura 2).

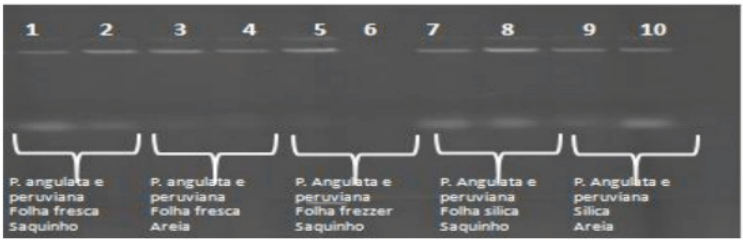


Figura 2: Analise Eletroforética do DNA genômico de *Physalis* L. utilizando o protocolo de Extração do DNA, Santos et al (2014). Amostras aplicadas com volume de 5µL. Amostras de genótipos da Unidade Experimental Horto Florestal.

Segundo Romano e Brasileiro (1999) essa boa qualidade é definida pela falta de DNA confinado no poço e de arraste vertical no gel, na devida ordem. A liberação de DNA também foi favorecida pela maceração das folhas com o tampão onde foi acrescentada uma maior quantidade em porcentagem de CTAB (tampão de extração), este protocolo decorreu de modificações nas etapas de maceração e na maior porcentagem do CTAB (tampão de extração), possibilitando a obtenção de materiais com melhor qualidade e quantidade do que foi encontrado no protocolo anterior.

O aumento da concentração de CTAB no tampão apresentou a quantidade e qualidade do DNA extraído (Figura 2). O procedimento com CTAB tem sido muito empregado para extração de tecidos frescos e diversos protocolos têm sido apresentados para esse propósito, (Machado, 1990). O tampão com o CTAB na concentração de 10% foi eficiente para a extração de DNA no protocolo 2 quando comparado com o tampão de extração de concentração de 5% de CTAB do protocolo 1. Protocolos que utilizam CTAB na extração tem o efeito de proporcionar a degradação dos ácidos nucleicos dos polissacarídeos, já que os polissacarídeos possuem dissolução especifica na presença desse detergente (ROMANO & BRASILEIRO, 1999).

Autores como Schmitt et al. (2014) e Ferreira et al. (2008), testaram concentrações de CTAB (2% e 5%) e verificaram que apenas na concentração de 5% houve isolamento de DNA, sendo que Schmitt et al. fazendo extração de *Curcuma longa* (Zingeberaceae) observaram que a concentração de 2% não foi eficaz e resultado semelhante foi encontrado por Ferreira et al. (2008), que afirmam que com a utilização de CTAB a 2% não houve isolamento de DNA de buriti na extração.

Segundo Silva et al. (2014) utilizando o CTAB a 5% a uma maior eficiência na extração de DNA de *Anacardium giganteum* ultilizando folhas jovens. Neste trabalho destaca-se que a concentração de CTAB de 10% obteve uma melhor eficiência no processo de extração.

Analisando a totalidade e qualidade dos DNAs extraídos, verificada pela eletroforese em gel de agarose, apresentada nas Figuras 1 e 2. Foram obtidas amostras íntegras de DNA através do protocolo 2 para as amostras analisadas, pois não se notou arraste vertical dos DNAs no gel, em grandes proporções que pudessem afetar a

qualidade do material extraído.

CONCLUSÕES

Entre os dois protocolos testados neste trabalho tendo como base o método CTAB o que apresentou melhor resultado foi o de Santos et al (2014). A aplicação de CTAB na concentração de 10% foi mais efetivo no isolamento de DNA para *physalis* L. Ao usar este protocolo o trabalho se encontra mais econômico pelo fato da não utilização do nitrogênio liquido. Sendo assim este protocolo é o mais apontado para trabalhos com extração de DNA de *Physalis* L. Foram obtidas amostras de DNA de qualidade e em quantidade satisfatória através do protocolo 2, assim, o método com CTAB 10% no tampão de extração pode ser utilizado para isolamento de DNA tendo potencial para ser utilizado em posteriores análises moleculares em espécies de *Physalis* L.

REFERÊNCIAS

ARBI, Guetat et al. Um método simples, rápido e eficiente para a extração de DNA genômico de Allium roseum L. (Alliaceae). **African Journal of Biotechnology** , v. 8, n. 17, 2010.

BUENO, Valquiria. DNA e aperfeiçoamento das técnicas de extração. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 4, p. 233-234, 2004.

DOYLE, Jeff J.; DOYLE, Jane L. Isolation ofplant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n. 13, p. 39-40, 1990.

FERREIRA, Maria Fernanda Maia et al. **Avaliação da eficiência de três metodologias de extração de DNA do buriti (Mauritia flexuosa Mart.) a partir de folhas e caule**. In: IX Simpósio Nacional do Cerrado. Brasília, 2008.

HSIEH, Wen-Tsong et al. Physalis angulata induced G2/M phase arrest in human breast cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 7, p. 974-983, 2006.

KENNELLY, Edward J. et al. Indução de quinona redutase por withanolides isoladas de Physalis philadelphica (tomatillos). **Journal of Agricultural and Food Chemistry** , v. 45, n. 10, pág. 3771-3777, 1997.

MACHADO, M. A. (1990). Isolation of DNA from Frech Tissue: **Focus**, 12. (1). p. 13.

OLIVEIRA, MC de S. et al. Fundamentos teóricos-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase. **Embrapa Pecuária Sudeste-Livro científico (ALICE)**, 2007.

OLIVEIRA, Luciana do Valle Rego et al. Genetic analysis of species in the genus Catasetum (Orchidaceae) using RAPD markers. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 2, p. 375-387, 2010.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas. **Biotecnologia**, v. 2, n. 9, p. 40-43, 1999.

RUFATO, A.R. et al. Avaliação física, química e fitoquímica de frutos de Physalis, ao longo do período de colheita. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 4, p. 1004-1012, dez. 2012.

SANTOS, R. M. et al. A protocol for large scale genomic DNA isolation for cacao genetics analysis. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 7, p. 814-820, 2014.

SILVA, Bruna et al. Protocolo para extração de DNA genômico de Anacardium giganteum W. Hancock ex Engl.(Anacardiaceae). **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 19, 2014.

SCHMITT, Kátia Fabiane Medeiros et al. Estabelecimento e otimização de protocolo para extração e amplificação de DNA em tecido foliar de Curcuma longa.(L). **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, p. 1560-1568, 2014.

ZOLET, Andreia Carina Turchetto et al. Marcadores moleculares na era genômica: metodologias e aplicações. 2017.

CAPÍTULO 14

PERSPECTIVAS DEL TRATAMIENTO MÉDICO DE LA ECHINOCOCCOSIS QUÍSTICA. GENERACIÓN DE EVIDENCIA CLÍNICA EN SU UTILIZACIÓN PRE Y POST QUIRÚRGICA

Data de aceite: 26/05/2021

Walner Daniel da Rosa Alvarez
Policlínica de Hidatidosis Humanas, Departamento de Parasitología y Micología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República

Marcela Risso
Policlínica de Hidatidosis Humanas, Departamento de Parasitología y Micología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República

Carlos Russi
Policlínica de Hidatidosis Humanas, Departamento de Parasitología y Micología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República

Elisa Figueredo
Policlínica de Hidatidosis Humanas, Departamento de Parasitología y Micología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República

Ana María Acuña
Policlínica de Hidatidosis Humanas, Departamento de Parasitología y Micología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República

RESUMEN: La equinococosis quística (EQ) es una enfermedad crónica considerada desatendida. La cirugía, que utiliza varios enfoques técnicos, tiene el potencial de eliminar de manera segura el quiste o los quistes y conducir a una curación completa en un gran número de pacientes con formas simples de EQ. Sin embargo, en los últimos años el tratamiento médico con benzimidazolicos como el Albendazol ha tomado mayor relevancia tanto en el preoperatorio como en postoperatorio. La existencia de un consenso sobre el conjunto de pautas de tratamiento dentro del Grupo de Trabajo Informal sobre Equinococosis (OMS-IGWE), no ha logrado que existan diferencias en la interpretación del régimen y dosis de los agentes terapéuticos, y en los parámetros clínicos e inmunológicos, así como las técnicas de imagen utilizadas en el seguimiento. Este estudio muestra que el tratamiento peroperatorio optimo es de 30 días con una viabilidad de los protoescolex de solo 3%. Además, la importancia de instaurar tratamiento postoperatorio, con un mínimo de 3 a 6 series en tratamiento discontinuo, lo que puede lograr curaciones y mejorías en el 85% de los casos con un seguimiento de 5 años. Por lo que las perspectivas del uso del tratamiento médico de la EQ aumentan con la evidencia clínica disponible.
PALABRAS CLAVES: Echinococcosis, quimioterapia, periodo preoperatorio, periodo postoperatorio.

ABSTRACT: Cystic echinococcosis (CY) is a chronic disease considered neglected. Surgery, using various technical approaches, has the potential to safely remove the cyst (s) and lead to complete healing in many patients with simple forms of EQ. However, in recent years medical treatment with benzimidazoles such as Albendazole has become more relevant both preoperatively and postoperatively. The

existence of a consensus on the set of treatment guidelines within the Informal Working Group on Echinococcosis (WHO-IGWE), has not resulted in differences in the interpretation of the regimen and dose of therapeutic agents, and in the clinical and clinical parameters. immunological, as well as the imaging techniques used in the follow-up. This study shows that the optimal perioperative treatment is 30 days with a viability of the protoescolex of only 3%. In addition, the importance of establishing postoperative treatment, with a minimum of 3 to 6 series in discontinuous treatment, which can achieve cures and improvements in 85% of cases with a 5-year follow-up. Therefore, the prospects for the use of the medical treatment of CD increase with the available clinical evidence.
KEYWORDS: Equinococcosis, Drug therapy, preoperative period, postopetative period.

RESUMO: A equinococose cística (EQ) é uma doença crônica considerada negligenciada. A cirurgia, usando várias abordagens técnicas, tem o potencial de remover o (s) cisto (s) com segurança e levar à cura completa em um grande número de pacientes com formas simples de EQ. No entanto, nos últimos anos, o tratamento médico com benzimidazóis, como o albendazol, tornou-se mais relevante tanto no pré-operatório quanto no pós-operatório. A existência de um consenso sobre o conjunto de diretrizes de tratamento dentro do Grupo de Trabalho Informal sobre Equinococose (OMS-IGWE), não resultou em diferenças na interpretação do regime e da dose dos agentes terapêuticos, e nos parâmetros clínicos e inmunologicos, bem como as técnicas de imagem utilizadas no seguimento. Este estudo mostra que o tratamento perioperatório ideal é de 30 dias, com viabilidade do protoescolex de apenas 3%. Soma-se a isso a importância de estabelecer um tratamento pós-operatório, com um mínimo de 3 a 6 séries em tratamento descontínuo, que pode alcançar cura e melhora em 85% dos casos com seguimento de 5 anos. Portanto, as perspectivas de utilização do tratamento médico da EQ aumentam com as evidências clínicas disponíveis.
PALAVRAS-CHAVE: Equinococose, Tratamento farmacológico, Período Pre-operatório, Periodo pós-operatório.

INTRODUCCIÓN

La hidatidosis es una zoonosis parasitaria, producida por la presencia de larvas de Cestodos del género *Echinococcus* que afectan tanto al hombre como a los animales. [1]

Dentro de este género, la especie más prevalente a nivel mundial es *Echinococcus granulosus*, agente de la Hidatidosis unilocular o quística, problema de salud pública y animal a nivel mundial.

La Echinococcosis quística (EQ) está incluida en la lista de 18 enfermedades Tropicales diligenciadas denominada por las siglas en inglés (NTD) desde 2013, estando en una lista de prioridades para su control por WHO desde 2005. La Iniciativa de Control y Eliminación de la Echinococcosis en América Latina, está compuesta por varios países: Argentina, Brasil, Paraguay, Chile, Perú y Uruguay, siendo la herramienta actual para llegar a que este importante problema se salud pública pueda ser contenido. [2]

El número real de casos en algunas áreas endémicas puede alcanzar los 2.500

por 100.000 habitantes, considerando a los portadores asintomáticos de quiste hidatídico, superando incluso los 10.000 por 100.000 habitantes en algunas áreas con predominio de población originaria. [3]

El índice de letalidad medio estimado en 2.9%, en el período 2009-2014 para los cinco países de la Iniciativa, sugiere que hubo más de 800 muertes debidas a Hidatidosis. La proporción de casos de Hidatidosis reportados en niños menores de 15 años (que indica riesgo ambiental persistente que conduce a nuevos casos) fue de 15% en el mismo período. Por países, el 15.8% de los casos de Argentina ocurrieron en niños de 15 años o más jóvenes, el 18.5% en Brasil, 15.1% en Chile, 17.04% en Perú. [3]

Uruguay solo informo de un 6.5% de casos en menores de 15 años en el periodo 209-2014. No existiendo datos de esa fecha hasta el presente. Las estadísticas más confiables son los ingresos y egresos hospitalarios que desde 2014 a 2019 suman 540 casos de hidatidosis, con 8% de niños menores de 15 años. [4]

En el último informe de la región de América del Sur 2016-2017, se reportaron en este periodo 6.268e 6.268 casos humanos de EQ reportados por Argentina, Chile y Perú, 62 casos resultaron en muerte. La EQ fue responsable por un total de cerca de 807 días de hospitalización entre Brasil, Chile y Perú. El 13,9% de los casos registrados en el periodo ocurrieron en menores de 15 años, indicando la persistencia de la infección en el ambiente. Sin embargo, la subnotificación de casos es un hecho extensamente reportado en enfermedades desatendidas, que afecta por igual a la Hidatidosis, por lo que con toda seguridad el número de casos es mayor. [3]

Este panorama epidemiológico se ve complicado por las distintas presentaciones clínicas en cada país, los sistemas de salud existentes y la oportunidad diagnóstica.

Todo este contexto, hace que el tratamiento médico tome aún más relevancia, tanto en los programas de control existentes como en la farmacoterapia de cada paciente con EQ.

Para instaurar un tratamiento médico adecuado, el diagnóstico se basa en cuatro pilares: clínico, epidemiológico, imagenológico, parasitológico y serológico. Debiéndose tener en cuenta, el tamaño del quiste hidático (QH), estadio y su ubicación anatómica.

Los progresos en el área de las técnicas imagenológicas, su portabilidad y bajo costo, hacen de la ecografía un uso permanente en el diagnóstico clínico. Sea utilizada como técnicas de screening en programas de control, orientadoras de posibles QH en sujetos sintomáticos o en hallazgos casuales por estudios de otras patologías.

Por otra parte, la serología es valida en sujetos que se diagnostican por primera vez, pero poco relevante en el seguimiento de esta enfermedad.

Actualmente el fármaco de elección es el Albendazol (ABZ), el cual tiene mayor eficacia, debido a una mayor absorción intestinal y mayor nivel de concentración sanguínea. El ABZ difunde a través de la cutícula de la hidátide, actuando sobre la capa germinativa, donde inhibe la síntesis de tubulina citoplasmática con el consiguiente bloqueo de la

absorción de la glucosa por parte del parásito. De esta forma ocurre una depleción de glucógeno y alteraciones degenerativas del retículo endoplásmico y mitocondrias. Lo que determina degeneración de membranas: vacuolización, pérdida de microtriquinas, aumento autofagosomas y depósitos lipídicos.

Todos estos eventos a nivel quístico repercuten en una gradual reducción de la presión intraquística por disminución de la secreción de fluido hidático, causando la detención del crecimiento del quiste y la posibilidad de desprendimiento de membranas, pudiéndose observar diferencias en el patrón ecográfico, que luego se confirman con la cirugía, reemplazando el límpido fluido quístico por un fluido turbio. [5,6]

El ABZ una vez ingerido es rápidamente metabolizado a nivel hepático a sulfóxido, su metabolito activo. Se absorbe con facilidad asociado a grasas, alcanzando la máxima concentración a las 24 hs., la vida media del metabolito se sitúa en las 8 hs. y media. El efecto terapéutico se produce cuando las concentraciones del sulfóxido en suero, alcanzan los 100 μgr/ml.[7,8]

Uno de los últimos fármacos utilizados para el tratamiento de la hidatidosis, sea en terapias combinadas con ABZ o sólo, es el Praziquantel (PZQ). La absorción intestinal de este fármaco es rápida, circulando 80% unido a proteínas plasmáticas. Su principal mecanismo de acción es aumentar la permeabilidad de la membrana del parásito al calcio, afectando la viabilidad de estas y de los protoescólices. [9-10]

En clínica humana el fármaco de elección para el tratamiento médico de la hidatidosis es el ABZ, siendo utilizado a dosis de 10 - 15 mg/kg/día. Generalmente administrado en 2 a 3 tomas con las comidas de alto tenor graso, para su mejor absorción. Los ciclos de tratamiento son series de 30 días con 15 días de descanso entre estas, aunque en los últimos años se ha preconizado el tratamiento continuo sin descanso. No existiendo en la literatura trabajos que destaquen la eficiencia de uno u otro uso [11-13]

Es posible que durante el tratamiento con ABZ se presenten reacciones adversas y/o tóxicas o mala respuesta terapéutica de este fármaco. En estos casos puede utilizarse el Praziquantel (PZQ) asociado al ABZ (disminuyendo la dosis de este a la mitad) o solo, como fármaco de segunda elección. La dosis de PZQ es de 40 mg/kg/día con igual duración de los ciclos que para el ABZ. [14]

La indicación de la farmacoterapia es evitar tratar las equinococosis secundarias, por su efecto protoescolicida y/o facilitar la cirugía al disminuir la tensión quística.

El tratamiento preoperatorio, es cada vez más frecuente y será condicionado por la oportunidad quirúrgica, teniendo al menos un mínimo de 7 días a 30 días de tratamiento. No existen consensos al respecto, sin embargo, la posibilidad de evitar complicaciones o siembras de material quístico, hacen justificado el uso de fármacos antihelmínticos. [15]

El tratamiento postoperatorio, debe realizarse en todos los casos, no dependiendo de la localización. La duración del tratamiento es un gran problema, dado que todavía no hay consenso a nivel internacional. Solo dos series de estudios de placebo-controlados

han sido realizadas, sin embargo, la conclusión a la que se ha llegado en ellas es que los benzimidazolicos son claramente beneficiosos y presentan un gran impacto en los tratamientos a largo plazo. [16]

Sin embargo, las evidencias clínicas e imagenológicas que demuestran que el aumento en la duración del tratamiento, con decrecimiento del tamaño o involución de estructura internas, no ha cambiado en las series clínicas consultada la proporción de pacientes con cura.

El presente trabajo es la experiencia de 24 años en el tratamiento preoperatorio y postoperatorio de pacientes con Echinococcosis Quística en Uruguay.

METODOLOGÍA

Se realizo un estudio descriptivo - retrospectivo de todos los casos de hidatidosis que consultaron en la policlínica de tratamiento médico de hidatidosis, Departamento de Parasitología y Micología, Instituto de Higiene – Montevideo, Uruguay- durante el periodo comprendido entre enero de 1996 a diciembre de 2020.

Se utilizo programa Epi Info ™ 7, para la confección de una base de datos de todos los pacientes que concurrieron en el periodo indicado.

Se realizo la definición y operacionalización de variables como: localización del QH, tamaño, fármacos utilizados en el tratamiento médico, duración del tratamiento, criterios de evolución de las lesiones desde el punto de vista imagenológico(en los quistes remanentes de estadios activos CE1, CE2 o CE3b a estadios transicional CE3a o estadios inactivos CE4 o CE5, observados mediante imagenología – Tomografía axial computarizada (TAC) y/o Resonancia magnética (RM), criterios evaluación del tratamiento postoperatorio (se clasificaron como exitosos (curación o mejoría marcada) o sin éxito (sin cambios o empeoramiento). La curación se definió como la desaparición del quiste (s) y la mejoría marcada se definió como una reducción del tamaño del quiste de ≥ 25%, transición a la fase inactiva (CE4, CE5) en la evaluación de seguimiento, según pautas IWEG – WHO) [5]

Se dividió a los pacientes en dos grupos: a) tratamientos preoperatorios, en donde se obtuvo líquidos con protoescolex y efectuó estudios de vialidad, con el uso de eosina al 2%., b) post operatorio.

Se revisaron los protocolos de tratamiento y seguimiento utilizados en cada uno de los pacientes durante el periodo de estudio, evaluando la eficacia del tratamiento en cada caso.

RESULTADOS

En el periodo comprendido entre enero de 1996 a diciembre del 2020, fueron evaluados 109 pacientes portadores de hidatidosis de diferentes localizaciones, derivados

por sus médicos tratantes a la policlínica de tratamiento médico de hidatidosis.

Del total de pacientes de la serie, en 21 no se obtuvieron datos completos por fallas en el seguimiento (perdida de contacto, desinterés de los pacientes).

De los 88 restantes, el tamaño de los quistes hidáticos observados fueron: 0 a 7 cm 38,5% (n=42) Estadio CE1 a C2, ≥7 a 10cm 35 % (n=20) CE 1 a C3b y ≥10 a 27,55 cm (n=10) CE1 a C4. La mayoría de los quistes ≥ a 7 cm fueron extraídos por cirugía. En los casos de QH pulmonar siguiendo la escuela quirúrgica uruguaya todos fueron operados, tanto en niños como en adultos.

La ubicación hepática fue la más frecuente, seguida de la pulmonar, ósea y otras localizaciones (riñón, bazo, cerebrales).

Los casos catalogados como hidatidosis ósea (n=11), se discriminan según localización:10 casos en columna vertebral, 4 casos en huesos largos (fémur) y 5 casos en huesos planos (coxal).

El 21,1 % (n=23) se catalogó como hidatidosis de múltiple localización, definida como aquellos casos donde se evidencio por imagenología dos o más órganos de la economía parasitados.

Dentro de la serie estudiada, debemos discriminar situaciones de pérdida de domicilio de la Hidátide (n=4), de los cuales 2 pacientes se catalogaron como hidatidosis pélvicas (CE 3a) y los otros dos como hidatidosis múltiples (CE 1 a CE3b), ya que se observó coexistencia de numerosos quistes en otras localizaciones preferentemente en hígado y pulmones.

Del total de los 88 pacientes se observó que 14,1% (n=13), luego del primer acto quirúrgico, presentaron nuevos quistes, en un tiempo de 24 a 70 meses. Por lo que se catalogaron como siembra durante el acto quirúrgico, basados en dos criterios: búsqueda por imagenología posterior al acto quirúrgico y la no instauración de tratamiento médico preoperatorio y/o postoperatorio.

Dado lo extenso del tiempo de esta serie 24 años, la realización de tratamiento preoperatorio fue realizada en 25 pacientes, en un periodo de 2010 a 2020. El fármaco utilizado fue ABZ en dosis de 15 mg/kg/día. Variando el tiempo en 7, 15 y 30 días, según oportunidad operatoria. Observando que el porcentaje de los protoescolex que tomaron la coloración vital (inviables) fue aumentando con los días de tratamiento de un 47% a 97%. (Fig. 1 y Tabla 1)

El tratamiento postoperatorio, se realizó en el 100% de los 88 pacientes. Con series de 30 días de medicación, con 15 días de descanso, entre series. Los fármacos y dosis utilizados fueron: albendazol (ABZ) 15mg/kg/día y Praziquantel (PZQ) 40 mg/kg/día.

Se observó efectos secundarios en la primera o segunda serie de ABZ, como: alteración del enzimograma hepático 9% (n=8), alteración de la serie blanca –leucopenia- 2,3% (n=2) y alopecia 1.15% (n=1). En estos once casos se disminuyó la dosis de ABZ a la mitad y se sumó la dosis de PZQ anteriormente mencionada. En 5 casos por persistencia

de efectos secundarios se suspendió totalmente el ABZ, suministrando PZQ a dosis total, durante las series restantes.

En referencia al número de series recomendadas se observó que en aquellos casos de EQ a órgano único el promedio de series de tratamiento postoperatorio fue de hasta 6, con una media de 3 meses. En los casos hidatidosis de múltiple localización, el tratamiento llego a un máximo de 14 series promedio, con una media de 6. En los pacientes óseos se extendió el tratamiento hasta 20 o más series.

El periodo de seguimiento varió de un mínimo de 12 meses a 96 meses (promedio 31 meses). En todos se realizaron al menos un control imagenológico (TAC y/o RM) durante el seguimiento post medicación.

De los 88 pacientes, según criterios IWEG-WHO, tratados solo con ABZ, se catalogó como igual a 12 casos (13,6%), observándose solo un 10% de reducción de tamaño en 9 y 3 mostraron vesiculación endógena pasando de estadio CE3A a CE3b, volviéndose a instaurar tratamiento médico. En 37 casos (38,6%) se observó mejoría con evolución de estadios CE1 o CE2 a estadio transicional CE3a y estadios inactivos CE4 o CE5. En 34 casos (38,6%) se evidenció una curación con reducción de más del 25% de su tamaño con evidencias imagenológicas de calcificación total y en algunos casos desaparición de las imágenes quísticas remanentes.

En los casos donde se utilizó una o dos series de ABZ y hubo reacciones no deseadas por el fármaco, continuándose con PZQ. Se observo que el 60% tuvo una mejoría a estadios inactivos y que el otro 40% una curación. (Tabla 2)

DISCUSIÓN

En los últimos años se ha incrementado el uso del tratamiento médico de la equinococosis humana, previo a la cirugía o como tratamiento paliativo o curativo. A pesar de los esfuerzos de la OMS-IWGE para definir una nueva clasificación de pacientes para estandarizar y optimizar estudios y tratamientos por consenso, el manejo clínico de la equinococosis quística sigue siendo heterogéneo y variable [10].

Particularmente en América Latina por las situaciones epidemiológicas diferentes, se han preconizado regímenes terapéuticos que difieren en indicación, dosis, parámetros clínicos e inmunológicos y la técnica de imagen utilizada en el seguimiento de los pacientes (17-19)

El tratamiento médico suele estar indicado antes de la cirugía para reducir el tamaño de los quistes hidatídicos, esterilizarlos y evitar recaídas. El tiempo y las dosis empleadas son muy heterogéneos y dependen del tamaño y ubicación de los quistes y de la oportunidad quirúrgica. [12]

En estos trabajos el tiempo óptimo fue de 30 días, sin embargo, el tiempo de duración podría ser variable, al menos una semana. (12)

En nuestra experiencia, hemos observado que al aumentar los tiempos de 7 a 15 y 30 días se logra una viabilidad menor al 3% con un tratamiento completo de 30 días. Como efecto beneficioso para la cirugía se observa que la disminución de tamaño y tensión intraquística es considerable, aun en quistes óseos donde esto permite una mejor resolución del acto quirúrgico, menos cruento al desprender las membranas remanentes con más facilidad.

Otro punto crucial en el tratamiento médico - quirúrgico preoperatorio es la oportunidad quirúrgica y la conformación de equipos médico-quirúrgicos especializados en echinococcosis quística, formados por educación médica continua y en centros de referencia, lo cual nos ha dado mejores resultados con estadías más cortas de internación del paciente.

La duración del tratamiento postoperatorio variará según la ubicación y el tamaño del quiste. Observamos una respuesta terapéutica eficaz en los quistes hepáticos o pulmonares cuando tenían menos de 7 cm y recibían un tratamiento óptimo de 3 a 6 ciclos. Aunque el tamaño de los quistes en otras series es menor de 6 cm, la hipótesis es que la buena respuesta obtenida se correlaciona con la dosis máxima utilizada (15 mg / kg / día), obteniendo una mayor biodisponibilidad, concentración intraquística y tolerabilidad del fármaco [11,12].

En el hueso se observó una buena respuesta a los 6-12 ciclos, en quistes remanentes con acceso riesgoso alto a próximos actos quirúrgicos. Aunque en estos casos el riesgo de recaída o reactivación es muy elevado. [17]

Uno de los puntos cruciales para el seguimiento del tratamiento médico post quirúrgico, es el concepto de historia natural del quiste hidatídico y su clasificación según las imágenes observadas en cada caso. El advenimiento de las técnicas de imagen modernas representó un gran avance en el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de los pacientes con EC. Con estas nuevas herramientas, los médicos han trabajado en una clasificación basada en imágenes de los quistes y correlacionan las etapas del quiste individual con la historia natural y los procesos de involución inducidos por el tratamiento [12].

En la serie de pacientes presentada, la tasa de curación del 38.6% y la mejora del 38.6% con ABZ, son mayores que otras series en la literatura.[20]

En cuanto a los efectos adversos observados con la terapéutica con ABZ, el aumento de las enzimas hepáticas, leucopenia y caída del cabello, están de acuerdo con la literatura sobre los tratamientos con este benzimidazol. (12)

En estos casos la utilización de PZQ es la indicada, si bien en la serie presentada son pocos, los índices de curación y mejoría fueron de un 40 y un 60% respectivamente. Lo que permitía tener una mirada prometedora en la utilización de este fármaco solo o combinado con ABZ. Ello deberá ser corroborado con una mayor muestra de casos.

El seguimiento del paciente después del tratamiento debe ser por un total de 5 años. En este período se observan en la mayoría de los casos los cambios estructurales

y morfológicos de los quistes y la desaparición de pequeños quistes, principalmente pulmonares [12, 22].

Por otra parte, el tratamiento médico adquiere un valor real en los casos de pacientes con localización múltiple, cirugías múltiples o cuando la ubicación y / o la relación anatómica de los quistes, representan una cirugía de alto riesgo. En estos casos, el tratamiento médico con ABZ o PZQ a menudo puede ser la única forma de mejorar o incluso curar a estos pacientes. (22)

Por último, los avances en los planes de control, oportunidad de diagnóstico, técnicas disponibles y equipos especializados en los últimos años, en el tratamiento médico quirúrgico de la EQ en humanos hace posible plantear una perspectiva muy favorable en la utilización de terapéutica médica en el tratamiento de la EQ. Tendiendo cada vez más a la resolución médica de los casos y la no intervención quirúrgica. Hecho que tendrá ser de mayor estudio e investigación.

REFERENCIAS

1 **Eckert J, Gemmell MA, Meslin FX, Pawłowski ZS**. WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern. WHO/OIE: France; 2001. 2.

3. Informe Equinococosis - Nº 3 - Echinococcosis Salud Pública Veterinaria - PANAFTOSA - OPS/OMS, 2016-2017, marzo 2019

4. Division Epidemiology, Department of Health. Hospitable Departures CIE 10. Uruguay, 2018

5. **Davis A, Dixon H and Pawlowski ZS** Multicenter clinical trial of benzimidazole-carbamates in human cystic Echinococcosis. Bulletin of the World Health Organization(WHO) 1989; 67: 503-508.

6. **De Rosa F and Teggi A.** Treatment of Echinococcus granulosus hydatid disease with Albendazole. Ann Trop Med Parasitol 1990; 84: 467-472

7. **Casado N, Perez Serrano J, Denegri G, Rodriguez Caabeiro F** Development of a chemotherapeutic model for the in vitro screening of drugs against Echinococcus granulosus cysts: The effects of an albendazole sulphoxide combination. Int J Parasitol1996; 26: 59-65.

8. **Penicaut B, Maugein T, Maisonneuve H and Rossignol F** Pharmacocinétique et metabolite urinaire de l´albendazole chez l´homme. Bul. Soc. Path. Exot. 1983; 76:698-708.

9. **Saimot AG, Cremieux AC, Hay JM, Meulemans A, Giovanangeli MD, Delaitre B and Coullaud JP** El albendazol como tratamiento potencial de la hidatidosis. The Lancet (Ed. Esp) 1984 4: 1; 41-48.

10. **Brunetti E, Peter K, Vuitton D**, writing panel for the WHO-IWGE. Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. Acta Tropica 2010 114: 1-16.

11. **Pinto P.** Diagnosis, treatment and monitoring of hydatid disease. Rev Chil Cir 2017 69:94-98.

12. **Junghanss T, Menezes da Silva A, Horton J, Chiodini PL and Brunetti E.** Clinical Management of Cystic Echinococcosis: State of the Art, Problems and Perspectives. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2008 79(3): 301-311.

13**. Alvela-Suárez L, Velasco-Tirado V, Belhassen-Garcia M, Novo-Veleiro I, Pardo-Lledías J et al.** Safety of the Combined Use of Praziquantel and Albendazole in the Treatment of Human Hydatid Disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2014 90(5): 819–822

14. **Larrieu E, Del Carpio M, Salvitti Jc, Mercapide C, Susteric J, Panomarenko H, Costa M et al.** Ultrasonographic diagnosis medical treatment of human cystic echinococcosis in asymptomatic school age. Carrier: 5 year of follow-up. Acta Trop 2004; 91:5-13.

15 **Hussain Arif, S et al**.Albendazole as an adjuvant to the standard surgical management of hydatid cyst liver Sajad International Journal of Surgery 6 (2008) 448–451

16. **Stojkovic M, Zwahlen M, Teggy A, Vutova K, Cretu CM et al.** Treatment response of cystic Echinococcosis to Benzimidazoles: A systematic Review. PLOS Neglected Tropical Disease. 2009 3 (9): e524.

17. **Bonifacino R, Dogliani E, Craig PS.** Albendazole treatment and serological follow-up in hydatid disease of bone. Int Orthop 1997 21: 127–32.

18. **Larrieu E, Del Carpio M, Salvitti Jc, Mercapide C, Susteric J, Panomarenko H, Costa M et al.** Ultrasonographic diagnosis medical treatment of human cystic echinococcosis in asymptomatic school age carrier: 5 year of follow-up. Acta Tropica 2004; 91:5-13.

19. **Larrieu E, Frider B, del Carpio M, Salvitti JC, Mercapide C, Pereyra R, Costa M, Odriozola M, Pérez A, Cantoni G.** Sustercic J. Asymptomatic carriers of hydatidosis: epidemiology, diagnosis and treatment. Rev Panam Salud Pública; 2000 8:250-256.

20. **Alvela-Suárez L, Velasco-Tirado V, Belhassen-Garcia M, Novo-Veleiro I, Pardo-Lledías J et al.** Safety of the Combined Use of Praziquantel and Albendazole in the Treatment of Human Hydatid Disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2014 90(5): 819–822

21. **Franchi C, Di Vico B, Teggi A.** Long-term evaluation of patients with hydatidosis treated with benzimidazole carbamates. Clin Infect Dis 1999; 29(2):304-9. 16.

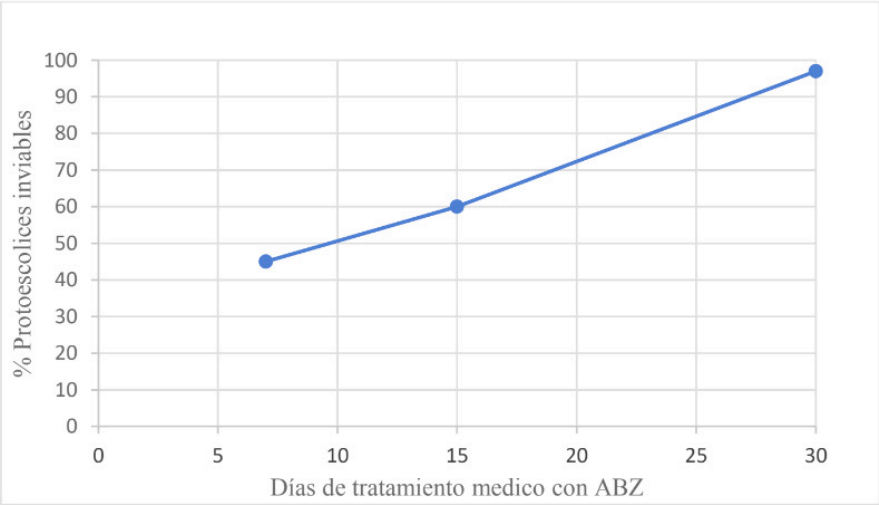
22. **Da Rosa, WD, Acuña, AM, Figueredo, E, Calegari, L, Ruso Martínez, L.** Manejo clínico de la equinococosis quística hepática, estadio CE3b, combinando tratamiento médico-estrategia de vigilancia y espera: a propósito de un caso. Rev Méd Urug 2017; 33(4):269-273

TABLAS Y FIGURA

N	días	% viables	% inviables
6	7	43	47
9	15	33	67
10	30	3	97

* Eosina al 2%

Tabla 1. Protoescolex en liquido hidático de pacientes con pretratamiento con ABZ *



Frag 1. Tendencia de protoescolex inviables en liquido hidático humano vrs días de tratamiento prequirúrgico con ABZ

Tratamiento	N° de casos	Evolución	Estado QH WHO IWEG	n	%
ABZ (15mg/Kg peso/día)*	83	Mejoría	CE1 , CE2	37	38.6
		Cura	CE1	34	38.6
		Igual	CE3a	9	10,2
		Peoria		3	3.4
ABZ and PZQ (7,5mg + 40mg/Kg peso/día) *	5	Mejoría	CE2	3	60
		Cura	CE1	2	40
		Igual		0	
		Peoria		0	

* Ciclos de 30 días y 15 días de descanso

Tabla 2. Clasificación de los pacientes con tratamiento médico postoperatorio según pautas WIEG - WHOO (n= 88)

CAPÍTULO 15

PARÂMETROS FISÍCOS-QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS PARA ANÁLISE DE ÁGUA POTÁVEL

Data de aceite: 26/05/2021
Data de submissão: 05/04/2021

Junior Rodoi da Silva
Graduando de Biomedicina, Centro Universitário São Francisco de Barreiras – UNIFASB
Barreiras – Bahia
http://lattes.cnpq.br/4309421132444689

Victor Abdiel de Souza de Brito
Graduando de Biomedicina, Centro Universitário São Francisco de Barreiras – UNIFASB
Barreiras – Bahia
http://lattes.cnpq.br/1211713159165872

Arielly Neri de Oliveira
Graduando de Biomedicina, Centro Universitário São Francisco de Barreiras – UNIFASB
Barreiras – Bahia
http://lattes.cnpq.br/8096448041532495

RESUMO: A água potável é um recurso finito e essencial para a vida animal e vegetal. O ser humano necessita de água em quantidade e qualidade adequadas para sua saúde e desenvolvimento econômico. O objetivo foi buscar na literatura os parâmetros físico-químicos e microbiológicos mais utilizados nos estudos para controle do saneamento básico da água potável. Para isso foi realizado uma revisão sistemática de caráter qualitativo, onde criou-se um protocolo de investigação para uma busca sucinta. Com isso foi obtido 24 artigos, sendo 20 de pesquisa de campo. Através desses artigos foi possível encontrar mais de 20 parâmetros diferentes utilizados, sendo os mais frequentes coliformes totais e/ou *Escherichia coli*, pH, turbidez, cor aparente e cloro livre.

PALAVRAS-CHAVE: Saneamento básico; água potável; físico-químico; técnicas microbiológico; parâmetros.

PHYSICAL-CHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL PARAMETERS FOR DRINKING WATER ANALYSIS

ABSTRACT: Drinking water is a finite and essential resource for animal and plant life. Human beings need water in adequate quantity and quality for their health and economic development. The objective was to search the literature for the physical-chemical and microbiological parameters most used in studies to control the basic sanitation of drinking water. For that, a systematic review of qualitative character was carried out, where an investigation protocol was created for a succinct search. Thus, 24 articles were obtained, 20 of which were from field research. Through these articles it was possible to find more than 20 different parameters used, with the most frequent total coliforms and / or *Escherichia coli*, pH, turbidity, apparent color and free chlorine.

KEYWORDS: Basic sanitation; potable water; physicochemical; microbiological techniques; parameters.

1 I INTRODUÇÃO

A água doce é um importante elemento para a manutenção da vida, e considerado

insubstituível em diversas atividades humanas. Cerca de 97% da água no planeta é proveniente dos oceanos, sendo apenas 3% de água doce (NETO *et. al.* 2013). Seu papel é essencial para vida animal e vegetal, causando impactos no desenvolvimento de civilizações desde a antiguidade. O ser humano necessita de *á*gua em quantidade e qualidade adequadas para proteção de sua saúde e para desenvolvimento econômico (PRAXEDES; CARRIJO; FREIRE; 2012).

Os meios naturais que transformam a água em água potável são limitados, frágeis e lentos (CARVALHO *et. al.* 2017). O desmatamento e avanço da urbanização associados a poluição de rios e lagos alteram o ciclo hídrico. Ademais, a falta de tratamento adequado do esgoto e lixo depositado de maneira inadequada são as principais causas de poluição (COYADO *et. al.* 2019; BRAGA *et. al.* 2016; SANTANA *et. al.* 2020). Segundo ANDRADE e MELO (2020), apenas 0,3% da água do planeta pode ser utilizada, e que ainda assim é impropria para consumo humano, necessitando passar por tratamento para eliminar as impurezas.

Em consequência dessas peculiaridades, se faz essencial um controle rigoroso por parte dos estados e municípios, e principalmente do responsável pelo fornecimento da água. Que devem manter um controle preventivo e permanente da qualidade da água potável. Cabendo ao fornecedor o monitoramento desde a saída da Estação de Tratamento de Água (ETA) até o acesso nas ligações domiciliares (LISBOA *et. al.* 2015). Dados apontam que 748 milhões de pessoas não possuem uma fonte segura de água potável e que 2,5 bilhão não tem acesso nem a instalações sanitárias adequadas (BRUM *et. al.* 2019). O consumo de água tratada é indispensável para qualidade de vida e para proteção contra enfermidades, principalmente aquelas relacionadas a fatores ambientais que podem ser evitadas (ARAÚJO; ANDRADE, 2020).

No Brasil, os gastos com tratamentos de doenças disseminadas ou causadas por água contaminada são exorbitantes. Estima-se que cerca de 70% dos leitos hospitalares sejam ocupados por pessoas que se contaminaram com doenças transmitidas pela água (SILVA *et. al.* 2020; SOUZA *et. al.* 2016). A qualidade da água é aplicada a características físicas, químicas e biológicas adequadas para consumo humano. Quando esses *não se enquadra*m aos limites de contaminação, ela se torna uma fonte de disseminação de doenças, como a cólera, febre tifoide e infeções gastrointestinais. Em 2010, o número de internações por doenças relacionadas ao saneamento básico foi de 31,83 para 10 mil habitantes, reduzindo em 2017 para 12,46 para 10 mil habitantes. Mesmo com a redução, os números ainda são altos e estão longe de representar uma melhora significativa (SILVA *et. al.* 2015; ANDRADE; MELO, 2020).

O direito de consumir água de qualidade no Brasil foi estabelecido pelo Decreto Federal nº 79.367 de 9 de março de 1977. Desde então, o governo brasileiro tem desenvolvido novas legislações afim de garantir o controle e vigilância na água potável. Atualmente regulamentada pela portaria nº 2914/11 do Ministério da Saúde e afirmada na

portaria de consolidação nº 5 de 28/09/2017. A qual determina os procedimentos de controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e define o padrão de potabilidade (VIANA *et. al.* 2018; SILVA *et. al.* 2020). A vigilância e o controle da qualidade da água para ingestão humana consistem no conjunto de ações e atividades adotadas constantemente pelas autoridades de saúde pública. A*ções* essas, que tem como objetivo atestar que a água cumpra padrões e normas estabelecidas na legislação vigente e para classificar os riscos que a água consumida representa para a saúde da população (BRASIL, 2017).

Nesse sentido, a água para ser classificada como potável necessita de tratamento apropriado de maneira que atenda a Portaria de Consolidação nº 5, de 2017 do Ministério da Saúde, Anexos XX e XXI. Em que, na regulamentação inclui-se principalmente os parâmetros microbiológicos, químicos e físicos, assim como seus valores de referência, que devem atender ao padrão de potabilidade da água, não oferecendo riscos a saúde da população (BRASIL, 2017). Desse modo, o objetivo principal dessa revisão foi buscar na literatura os parâmetros físico-químicos e microbiológicos mais utilizados nos estudos para controle do saneamento básico da água potável e se eles atendem os critérios do Ministério da Saúde.

2 I METODOLOGIA

A pesquisa de carater qualitativo buscou artigos completos que se associavam ao objetivo da pesquisa. Em seguida, foi realizado uma leitura do título e resumo para filtrar os artigos que melhor se relacionavam com o tema. A busca foi feita nas bases de dados Periódicos CAPES e Google Acadêmico, averiguou-se artigos em inglês, espanhol e português publicados nos últimos 10 anos. Também foi utilizado das portarias relacionadas ao assunto, conforme consta no Ministério da Saúde.

O presente trabalho trata-se de uma revisão sistemática da literatura. Para uma busca sucinta foi elaborado um protocolo de pesquisa, onde constam a questão de investigação, as bases de dados e critérios de inclusão e exclusão conforme a Tabela 1. Como descritores para busca foi utilizado, saneamento básico, água potável, tratamento físico-químico, técnica microbiológica conforme consta no Descritor em Ciências e Saúde (DeCS/MeSH).

Questão da investigação	Quais são os parâmetros físico-químicos e microbiológicos mais utilizados nos estudos para controle do saneamento básico da água potável?			
Base de dados	Google Acadêmico	Periódico CAPES		
Critérios de inclusão	Artigos publicados nos últimos 10 anos	Artigos completos em inglês, português ou espanhol	Estar relacionado com a questão de investigação	Estar relacionado a distribuição e consumo de água potável
Critérios de exclusão	Publicados fora do prazo estipulado	Não condizem com o tema da pesquisa	Possuem dados contraditórios	Não se atrelam a área da saúde

Tabela 1: Protocolo de pesquisa

Fonte: Autores

3 I RESULTADOS E DISCUSSÕES

Após aplicação da metodologia, foram selecionados 24 artigos, 3 no Periódico CAPES e 21 no Google Acadêmico. Destes, 23 estavam em português e 1 em inglês. Dos 24 trabalhos, 2 eram de revisão literária, 2 de analise de dados e 20 de pesquisa de campo, com questionários e/ou analises laboratoriais. Todas as pesquisas de campo foram realizadas no Brasil, com exceção de MANUEL *et. al.* (2018), que foi realizado na cidade de Uíge na Angola e analisou 23 parâmetros diferentes encontrando inconformidades para todos, em pelo menos uma das amostras.

Todas as portarias que refere a normas e padrões de potabilidade da água procederam do Decreto n.º 79.367, de 9 de março de 1977, que concedeu autonomia ao Ministério da Saúde para estabelecer os padrões. Os quais devem ser adotados obrigatoriamente pelos órgãos dos estados e municípios (BRASIL, 1977). Na atual Portaria de Consolidação n. 5, de 2017, Anexos XX e XXI, do Ministério da Saúde, constam 92 parâmetros para potabilidade da água. Sendo esses descritos como, 3 para microrganismo, 15 para química inorgânica, 15 para química orgânica, 27 para agrotóxicos, 7 para desinfetantes, 2 para cianotoxinas, 2 radioatividade e 21 de organolépticos. A portaria traz ainda no art. 3º e 4º do anexo XX, que toda a água que é destinada ao consumo humano de forma individual ou coletiva independente da forma de acesso deve ou está sujeita ao controle de vigilância da qualidade da água (BRASIL, 2017).

Dentre as pesquisas de campo analisadas, foi possível observar mais de 20 parâmetros diferentes utilizados, classificados como microbiológicos e físicos-químicos. Em que, físico-químico inclui química orgânica e inorgânica, agrotóxicos, desinfetantes e organolépticos, nenhum parâmetro para cianotoxinas e radioatividade foi observado. Na Tabela 2, é possível observar os 12 parâmetros que mais foram utilizados nos 20 estudos realizados. Sendo os mais aplicados, coliformes totais/*Escherichia coli*, pH, turbidez,

cor aparente e cloro livre. Assim como podemos constatar a realização da pesquisa de coliformes totais e *Escherichia coli* em todos os trabalhos com exceção de BRITO *et. al.* (2019) que realizaram sua pesquisa na Universidade Federal do Pará, analisando apenas parâmetros físicos-químicos (pH, cor aparente, turbidez, sólidos totais em suspensão, temperatura, cloro residual livre, dureza total e nitrogênio amoniacal).

Parâmetros	***Quantidade de trabalhos que realizaram o parâmetro***	***Valor de Referência (VR)***	***Quantidade de trabalhos que encontraram inconformidades***
Coliformes totais e/ou *Escherichia coli*	19 trabalhos	Ausência em 100 mL	17 trabalhos
pH	18 trabalhos	6 – 9,5	7 trabalhos
Turbidez	17 trabalhos	1 uT (VMP)	9 trabalhos
Cor aparente	9 trabalhos	15 uH (VMP)	5 trabalhos
Cloro livre	9 trabalhos	0,2 – 2 mg/L	6 trabalhos
Nitrato	6 trabalhos	10 mg/L (VMP)	3 trabalhos
Dureza total	6 trabalhos	500 mg/L (VMP)	1 trabalhos
Sólidos dissolvidos totais	5 trabalhos	1000 mg/L (VMP)	2 trabalhos
Cloreto	4 trabalhos	250 mg/L (VMP)	Não encontrado
Amônia	4 trabalhos	1,5 mg/L (VMP)	1 trabalhos
Alumínio	3 trabalhos	0,2 mg/L (VMP)	2 trabalhos
Ferro	3 trabalhos	0,3 mg/L (VMP)	3 trabalhos

Tabela 2: Parâmetros mais utilizados

Fonte: Autores

Podemos assim, caracterizar também o pH como parâmetro igualmente mais utilizado. Já que ele não foi utilizado apenas nas investigações de PORCY *et. al.* (2020) e VIANA *et. al.* (2018) que analisaram somente microrganismos presentes nas águas. De acordo com FURTADO *et. al.* (2017) que encontrou inconformidades para pH em 100% das amostras analisadas. O pH é tido como parâmetro chave no controle do processo de coagulação onde seu desempenho é fundamental para desinfecção.

A turbidez, que segundo BRITO *et. al.* (2019) é uma característica estética e também um indicador sanitário, é um parâmetro organolético que pode ser indicativo de falhas na efetividade do tratamento e pode dificultar o processo de desinfecção. Foi averiguada em 17 trabalhos onde 9 encontraram inconformidades. Na relação entre parâmetro pesquisado

com inconformidade encontrada é possível verificar que nas pesquisas feitas por ANDRADE e MELO (2020), CARVALHO *et. al.* (2017), NATALINO DE SÁ *et. al.* (2017) e SANTANA *et. al.* (2020) as analises para cloreto não encontrou inconformidades. Também é possível observar que todos os trabalhos realizados que averiguarão o ferro, feitas por FURTADO *et. al.* (2017), SANTANA *et. al.* (2020) e MANUEL *et. al.* (2018) encontraram valores alterados em pelo menos uma das amostras.

Ademais, em relação as 19 pesquisa de coliforme totais e/ou *Escherichia coli* realizadas, apenas as de CAMPOS *et. al.* (2019) e NETO *et. al.* (2013) não encontraram inconformidades. MORATO *et. al.* (2015) encontraram em 78% das amostras coliformes totais e em 22% *Escherichia coli*. Segundo VIANA *et. al.* (2018) a presença de coliformes totais não significa a contaminação fecal da água, mas pode indicar falhas no método de manipulação e falta de condições higiénicas e sanitárias. Ele traz ainda que a presença dessas bactérias é um fator preocupante, uma vez que isso pode indicar a contaminação por microrganismos patogénicos que são responsáveis pela propagação de doenças de veiculação hídrica.

No Gráfico 1, podemos visualizar a relação de pesquisas que realizaram os parâmetros com as inconformidades encontradas. Para essa análise foi considerado como inconformidades aqueles que apresentaram alterações nos valores determinados pelo Ministério da Saúde em pelo menos uma das amostras investigadas. Todos os trabalhos descreveram a higienização para a coleta da amostra, bem como a forma e tempo de armazenamento até a analise da amostra. Nenhuma inconformidade foi observada nessa relação.

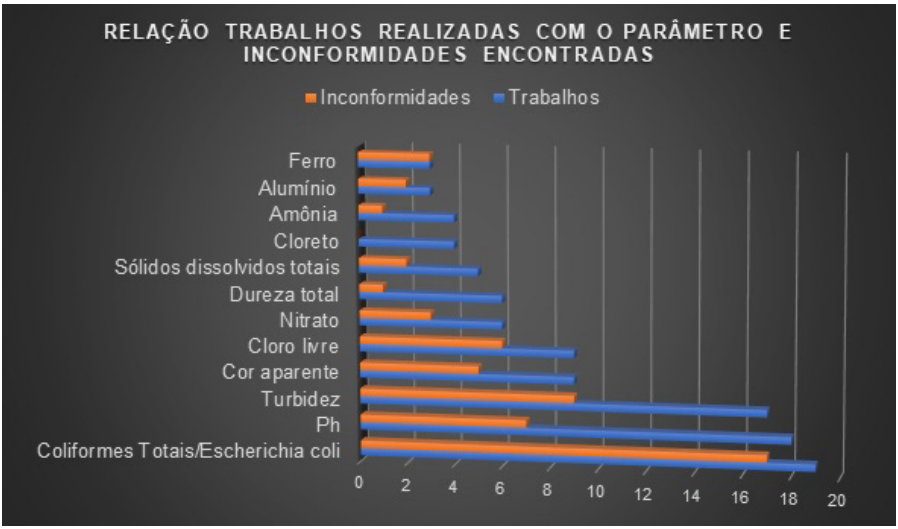


Gráfico 1: Relação parâmetros realizados com inconformidades encontradas

Fonte: Autores

Embora seja evidente a grande variação de parâmetros utilizados nas pesquisas, é possível constatar uma discrepância entre quantidade de métodos utilizados num trabalho, bem como a falta de um padrão. Enquanto MORATO *et. al.* (2015), GOBIRA e DUARTE (2018) e BRUM *et. al.* (2019) analisaram até 4 parâmetros, FURTADO *et. al.* (2017), SANTANA *et. al.* (2020) e MANUEL *et. al.* (2018) analisaram mais de 8. Podemos observar no Gráfico 1 ainda, que ao mesmo tempo que a pesquisa de coliforme totais, pH e turbidez foram feitas em 19, 18 e 17 trabalhos respectivamente. A analise de ferro, alumínio e amônia foram realizadas em apenas 3, 3 e 4 trabalhos respectivamente.

Nenhuma das pesquisas ou decretos estudados nessa revisão da literatura fez menção a um critério mínimo de parâmetros para caracterizar a água como própria para consumo humano. Os parâmetros, com exceção de coliformes totais e/ou *Escherichia coli*, pH e turbidez que foram os mais frequentes analisados, realizaram-se de forma aleatórias, tanto para analise da água tratada quanto para *á*gua bruta. Dessa forma, a criação de um padrão de parâmetros para analise de ambos os tipos de águas, dividida em grupos com características especificas para cada tipo e situação poderia ajudar a qualificar as pesquisas relacionadas a potabilidade da água.

4 I CONCLUSÃO

A busca na literatura revelou uma grande variedade no número de parâmetros possíveis a ser realizados. Nos trabalhos analisados pode se observar que a pesquisa de coliformes totais e/ou *Escherichia coli*, pH, turbidez, cor aparente e cloro livre foram os mais utilizados. Enquanto nitrito, fluor e manganês obtiveram investigação em apenas dois trabalhos.

A falta de um padrão mínimo de parâmetros para analisar a potabilidade da *água* deixa uma abertura para realização de pesquisas de forma aleatória. O que pode implicar na qualidade do trabalho, uma vez que a realização de um ou dois parâmetros não necessariamente é capaz de indicar que a água é de qualidade e apta para o consumo.

Podemos concluir assim que há uma necessidade de estabelecer um padrão de parâmetros para analise da água bruta e tratada, com critérios diferentes. Assim, direcionaria melhor as pesquisas relacionadas ao tema, dando mais qualidade as pesquisas e trazendo dados mais verídicos para sociedade.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, W. C.; MELO, C. M. **Aspectos físico-químicos e microbiológicos da água de consumo disponível para a comunidade rural de patrimônio dos Poncianos/MG.** Rev. Desafios. v. 7, n. 3, p. 337-348, 2020.

ARAÚJO, D. L.; ANDRADE, R. F. **Qualidade Físico-Química e Microbiológica da Água Utilizada em Bebedouros de Instituições de Ensino no Brasil: Revisão Sistemática da Literatura**. Braz. J. Hea. Rev., Curitiba – PR, Brasil, v. 3, n. 4, p. 7301-7324. Jul/Ago, 2020.

BRAGA, A. M. A. *et al.* **Diagnóstico da qualidade da água distribuída para o consumo humano na zona urbana de cidades do sudoeste baiano: reflexões sobre a saúde e educação ambiental**. Revista Metáfora Educacional. Feira de Santana – BA, Brasil. n. 21, p. 365-395, Jul/Dez, 2016.

BRASIL. Ministério Da Saúde. **Anexo XX, XXI da Portaria de Consolidação nº 5 do Ministério da Saúde de 03 de Outubro de 2017.** Editora do Ministério da Saúde. Brasília – DF, Brasil. Out. de 2017.

BRASIL. Ministério Da Saúde. **Portaria nº 2.914, de 12 de Dezembro de 2011.** Editora do Ministério de Saúde. Brasília – DF, Brasil. Dez. de 2011.

BRASIL. Decreto nº 79.367, de 9 de março de 1977. **Dispõe sobre normas e o padrão de potabilidade de água e dá outras providências.** Diário Oficial da União. Capital Federal: 10 mar. 1977, Seção I, Parte I, p. 2741.

BRITO, F. S. L. *et al.* **Utilização de diferentes metodologias para avaliação do consumo e qualidade da água dos bebedouros da Universidade Federal do Pará – UFPA**. Rev. gest. sust. ambient. Florianópolis – SC, Brasil. v. 8, n. 1, p.1043-1042. Jan/Mar, 2019.

BRUM, B. R. *et al.* **Qualidade das águas de poços rasos em área com déficit de saneamento básico em Cuiabá, MT: avaliação microbiológica, físicoquímica e fatores de risco à saúde.** HOLOS, v. 2, n. 32, p. 179-188, 2016.

CAMPOS, L. M. *et al.* **Qualidade da água destinada ao consumo humano em Iguatama, MG, Brasil**. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.16 n.29, p. 2446, 2019.

CARVALHO, A. P. *et al.* **Avaliação dos parâmetros de qualidade da água de abastecimento alternativo no distrito de Jamacaru em Missão Velha-CE**. Rev. de Iniciação Científica, Tecnológica e Artística. v. 7, n. 1, p. 35-51, 2017.

COYADO, G. A. *et al.* **Análises físico-químicas e microbiológicas de águas de pré e pós-tratamento na cidade de Jundiaí-SP**. Rev. Principia. João Pessoa -PB, Brasil. v. 1, n. 45, p. 200-207, 2019.

FURTADO, R. N. *et al.* **Avaliação da conformidade físico-química e microbiológica da água tratada e distribuída no município de Santana/AP.** Rev. Ibero-Americana de Ciências Ambientais. v. 8, n. 4, p. 101-110, Jun-Nov, 2017.

GOBIRA, C. A.; DUARTE, S. F. P. **Qualidade da água do Rio Ribeirão das Pedras e a água tratada para consumo no Município de Mata Verde-MG: Uma Análise Comparativa dos Fatores Físicos-Químicos e Microbiológicos.** Rev. Mult. Psic. v.12, n. 40. 2018.

LISBOA, G. M. *et al.* **Análise microbiana e do teor de flúor adicionado à água de abastecimento em um estado do nordeste do Brasil.** Rev Bras Promoç Saúde, Fortaleza - CE, Brasil. v. 28, n. 2, p. 216-222, Abr-Jun, 2015.

MANUEL, P. *et al.* **Qualidade da Água para Consumo Humano na Cidade do Uíge (Angola): Água Tratada do Sistema de Abastecimento Público e** Água não Tratada de Fontes Alternativas. Revista Internacional em Língua Portuguesa, n. 33, Ciências da Saúde e Tecnologia, pp. 75-93, 2018.

MORATO, C. B. *et al*. **Análise da qualidade da água nas unidades de saúde da família do município de Patos – PB.** Revista Brasileira de Educação e Saúde. Pombal – PB, Brasil. v. 5, n. 4, p. 43-47, Out-Dez, 2015.

NATALINO DE SÁ, J. P. *et al*. **Avaliação físico-química e microbiológica de água potável de uma instituição de ensino superior localizada na zona da mata mineira**. Revista Brasileira de Gestão Ambiental. Pombal – PB, Brasil. v.11, n.1, p. 209-214, Jan/Dez, 2017.

NETO, R. M. R. *et al.* **Avaliação do sistema de tratamento e da qualidade das águas de abastecimento público em Laranjal do Jari, AP**. Rev. Scientia Plena. v. 9, n. 11, p. 1-9, 2013.

PORCY, C. *et al*. **Avaliação microbiológica da água de consumo de casas localizadas em área alagada em um município do estado Amapá**. Revista Eletrônica Acervo Saúde. v. 12, n. 1, p. 1-9, 2020.

PRAXEDES, C. I. S.; CARRIJO, K. F.; FREIRE, R. G. S. **Controle físico-químico de água de abastecimento para consumo e uso industrial: sistema de tratamento, métodos de análise e parâmetros legais.** PUBVET, Londrina, V. 6, N. 26, Ed. 213, Art. 1420, 2012.

SANTANA, A. G. *et al.* **Physical-chemical and microbiological analysis of water from shallow wells in Imperatriz (MA), Brazil**. Rev. Ambient. Água. Taubaté – SP, Brasil. v. 7 (supplement), 2020.

SILVA, G. A. *et al.* **Análise físico-química e microbiológica da água tratada do município de Córrego do ouro.** Revista Faculdade Montes Belos. Montes Belos – GO, Brasil. v. 8, n. 1, p. 1-9, 2015.

SILVA, M. A. *et al.* **Qualidade da água designada ao abastecimento público de Rio Branco – Acre**, Rev. DêCiência em Foco. v. 4, n. 1, p. 140 – 150, 2020.

SOUSA, N. C. *et al*. **Análise físico-química e bacteriológica de coliformes totais e termotolerantes da água de consumo distribuída aos alunos de 3 creches privadas do setor leste da cidade de porto velho – Rondônia.** Rev. Saber Cientifico. Porto Velho – RO, Brasil. v. 5, n. 1, p. 24–32, 2016.

VIANA, M. J. *et al*. **Qualidade bacteriológica de amostras de água em escolas públicas do município de Tangará da Serra, Mato Grosso**. HOLOS, v. 06, n. 34, p. 74-81, 2018.

CAPÍTULO 16

PROJETO DE EXTENSÃO CIENTISTA NA ESCOLA: UM RELATO DE EXPERIÊNCIA

Data de aceite: 26/05/2021
Data de submissão: 07/03/2021

Tatiane do Nascimento Lima
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Aquidauana – Mato Grosso do Sul
http://lattes.cnpq.br/9261370775986062
http://orcid.org/0000-0002-0656-1170

Edihanne Gamarra Arguelho
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Aquidauana – Mato Grosso do Sul
http://lattes.cnpq.br/7313617015112675
https://orcid.org/0000-0002-4549-6762

Rogério Rodrigues Faria
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Aquidauana – Mato Grosso do Sul
http://lattes.cnpq.br/2420249057177493
https://orcid.org/0000-0003-0944-2190

RESUMO: No cenário educacional brasileiro, o Ensino Fundamental constitui-se como eixo central das discussões voltadas para assegurar o direito à educação. A estrutura e organização dessa etapa da Educação Básica têm sido objeto de mudanças em busca de melhorias que assegurem a democratização dos conhecimentos e a formação integral orientada ao desenvolvimento da autonomia intelectual e do pensamento crítico. O objetivo deste trabalho foi demonstrar para os alunos do Ensino Fundamental II a atuação de um cientista. Além disso, como eles podem ser cientistas no seu ambiente escolar. Por meio deste projeto espera-se contribuir para desmistificar a ciência, possibilitar aos alunos a compreensão da linguagem científica e capacitá-los para ampliarem seus conhecimentos de forma consciente. Os dados foram obtidos a partir das experiências de um Projeto de Extensão Cientista na Escola em conjunto com a Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e a Escola Estadual Professora Dóris Mendes Trindade, localizada no município de Aquidauana (MS). Foi observado que a integração entre a comunidade e a universidade possibilitou uma transformação da realidade educacional dos alunos envolvidos neste projeto. Ao apresentar o trabalho de um cientista para os alunos cumpriu-se o papel de desmistificação da ciência e a descoberta das universidades como centros de desenvolvimentos de pesquisas. O modelo de sequência didática focada no ensino por investigação despertou nos alunos curiosidade na busca por respostas para os problemas apresentados. As atividades desenvolvidas neste trabalho mostram caminhos para o exercício da cidadania, formando cidadãos capazes de refletir e transformar suas realidades pelo pensamento científico e crítico.

PALAVRAS-CHAVE: Ensino Fundamental, Ensino por Investigação, Ensino de Ciências.

EXTENSION PROJECT “SCIENTIST IN THE SCHOOL”: AN EXPERIENCE REPORT

ABSTRACT: In Brazilian education scenario, The Middle School level is a central axis of discussion to assure the education rights. The structure and

organization of this level in basic education ensure mechanisms of knowledge democratization and the holistic formation oriented to intellectual autonomy and critical thinking. The objective of this study was to show how scientists operate, to middle school students. Besides, how students can act as scientists in a scholar environment. By this project, it is expected to contribute to demystify science, to enable students the comprehension of scientific language and to enable them to expand their knowledge in a conscientious way. Data were collected from "Projeto de Extensão Cientista na Escola" experiences, a partnership with Universidade Federal de Mato Grosso do Sul and Escola Estadual Professora Dóris Mendes Trindade, both located in Aquidauana municipality. It was observed that the integration school-university opportuned a change in the educational reality from students involved. Presenting the scientists' work to students reached the objective in demystifying science and to assign universities as a place of research development. The didactic sequence model with focus in investigative teaching incited curiosity in the students to search answers to presented problems. The activities developed in this project show ways to exercise citizenship, forming citizens able to reflect and transform their realities by critical and scientific reasoning.
KEYWORDS: Investigative teaching, Middle School, Science Teaching.

1 I INTRODUÇÃO

Do ponto de vista histórico são relativamente recentes as disposições legais que tratam da organização do ensino no Brasil. A primeira Lei de Diretrizes e Bases da Educação Nacional, a Lei 4024 (BRASIL, 1961) estabeleceu instruções para o então chamado ensino primário que era composto por no mínimo quatro séries, podendo ser ampliado para até seis séries. Esse nível de ensino, que hoje corresponde ao ensino fundamental, tinha como objetivo o desenvolvimento do raciocínio e das atividades de expressão da criança, e a sua integração ao meio físico e social.

Em 1971 com a LDB 5692 (BRASIL, 1971) o ensino primário passou a ser denominado ensino de primeiro grau e objetivava a formação da criança e do adolescente, bem como o preparo para o trabalho e ao exercício da cidadania. No ano de 1996 a LDB 9394 (BRASIL, 1996), seguindo determinações da Constituição de 1988 (BRASIL, 1988), prevê a educação como direito de todo cidadão, visando novamente o desenvolvimento e preparo para a cidadania, incluindo sua qualificação para trabalho.

A partir da atual LDB 9.394/96 o Ensino Fundamental passou a ser assim designado e conjuntamente com a educação infantil e o ensino médio, passaram a compor a Educação Básica. No cenário educacional brasileiro, o Ensino Fundamental constitui-se como eixo central das discussões voltadas para assegurar o direito à educação. A estrutura e organização dessa etapa da Educação Básica têm sido objeto de mudanças em busca de melhorias que promovam a qualidade social (DCN 2013 – Resolução nº 4 de 13 de julho de 2010), entendida para além do acesso de estudantes à escola, assegurando, também, sua permanência no processo escolar, por meio da democratização de saberes e da formação integral rumo à sua emancipação.

O Ensino Fundamental II (6º ao 9º ano) traz como desafios criar condições para que os alunos aprendam a estudar e sejam capazes de fazê-lo com autonomia. Nesse período espera-se que o aluno desenvolva a compreensão do ambiente natural e social, do sistema político, da tecnologia, das artes e dos valores que se fundamentam a sociedade (Ministério da Educação - LDB 9394/96). Uma das maneiras de se alcançar os objetivos propostos pela LDB é o desenvolvimento de atividades que aproximem o aluno do conteúdo estudado de uma maneira significativa, ou seja, a educação precisa ser vista como parte do seu mundo e não apenas como um amontoado de conteúdo. Por exemplo, atividades focadas na busca por resolução de problemas podem gerar resolução simples para os problemas do cotidiano, de maneira a aproximar o trabalho de um aluno/cientista ao ambiente escolar.

Atividades de caráter investigativo implicam na proposição de situações-problemas, que orientam e acompanham todo o processo de investigação. Nesse momento o professor desempenha o papel de guia e de orientador das atividades – é ele quem propõe e discute questões, contribui para o planejamento da investigação dos alunos, orienta o levantamento de evidências e explicações teóricas, possibilita a discussão e a argumentação entre os estudantes, introduz conceitos e promove a sistematização do conhecimento (HODSON, 1994; LIMA & MAUÉS, 2006). Consequentemente, o professor oportuniza, de forma significativa, a vivência de experiências pelos estudantes, permitindo-lhes, assim, a construção de novos conhecimentos acerca do que está sendo investigado.

Segundo Carvalho et al. (2004), uma atividade investigativa não pode se reduzir a uma mera observação ou manipulação de dados – ela deve levar ao aluno a refletir, a discutir, a explicar e a relatar seu trabalho aos colegas. Dentro desse contexto, durante a busca por respostas, mediada por atividades investigativas, ocorre a alfabetização científica do aluno. Para Sasseron & Carvalho (2008) há três eixos estruturantes que servem de apoio aos planejamentos de ensino que têm como foco alfabetizar cientificamente os alunos. O primeiro eixo se refere à compreensão básica de termos, conhecimentos e conceitos científicos fundamentais; o segundo se refere à compreensão da natureza da ciência e dos fatores éticos e políticos que circundam sua prática; e o terceiro se refere ao entendimento das relações existentes entre ciência, tecnologia e sociedade.

O objetivo deste trabalho foi demonstrar para os alunos do Ensino Fundamental II a atuação de um cientista; e ainda, como eles podem ser cientistas no seu ambiente escolar. Por meio deste projeto espera-se: contribuir para desmistificar a ciência; possibilitar aos alunos a compreensão da linguagem da ciência para que sejam capazes de ampliar o universo de conhecimento sobre o mundo de forma consciente; aproximar a sala de aula do cotidiano do aluno; possibilitar com que o aluno imagine-se utilizando o que é tratado na sala de aula no seu futuro como cidadão e profissional; e gerar uma aproximação do aluno com o mundo acadêmico e profissional.

2 | PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Os dados foram obtidos a partir das experiências do Projeto de Extensão Cientista na Escola (Edital PROECE/UFMS nº 26/2019) em conjunto com a Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) e a Escola Estadual Professora Dóris Mendes Trindade (EEPDMT), localizada no município de Aquidauana (MS). As atividades apresentadas neste trabalho ocorreram nos meses de agosto e setembro do ano de 2019, durante as aulas de Ciências dos alunos do 6º e 7º ano. Participaram do trabalho 35 alunos e duas professoras da Escola e três professores da Universidade e doze graduandos em Ciências Biológicas.

O projeto ocorreu em duas etapas: a) a primeira foi desenvolvida na UFMS por meio de visitas aos Laboratórios de Zoologia e Microscopia (as atividades ocorreram no período vespertino entre 13:00 e 17:00 horas); b) a segunda ocorreu por meio de atividades na escola (envolvendo o período de quatro aulas de 50 minutos e uma apresentação na Feira de Ciências). A abordagem do estudo foi qualitativa. Durante as práticas foram utilizados recursos pedagógicos como o quadro negro, Datashow e vídeos para exposições de conceitos.

Nas duas etapas do projeto as atividades foram desenvolvidas seguindo as características do ensino por investigação (CARVALHO, 2013), de maneira que primeiramente foi apresentado para os alunos a seguinte sequência de elementos: Pergunta/Problema, Sistematização do conhecimento construído, Contextualização do conhecimento no dia a dia dos alunos e Atividade avaliativa final.

Na primeira etapa foi desenvolvida uma acolhida dos alunos na Universidade. Na recepção dos alunos os professores os receberam com a seguinte frase: "*Prazer eu sou um(a) cientista, vamos descobrir como eu trabalho*?". A partir daí foram apresentados os espaços de desenvolvimento de ensino e pesquisa. No Laboratório de Zoologia os alunos entraram em contato com a Coleção Zoológica (exemplares de Insetos, Peixes, Anfíbios, Répteis e Mamíferos), nesse momento foi apresentado a importância da coleção no desenvolvimento das pesquisas. Após a observação dos seres vivos, foi feita a seguinte pergunta: "*Como classificar os seres vivos*?".

Os professores contextualizaram a diversidade biológica de seres vivos e a importância da sua classificação. Nesse momento para a formação dos conceitos foram observadas as percepções dos conhecimentos prévios dos alunos, dessa maneira os sistemas de categorização e classificação foram construídos pelos sujeitos envolvidos na prática. Na sequência os alunos organizaram-se em cinco grupos e propuseram maneiras de classificar os espécimes que estavam na bancada dentro de grupos zoológicos. Como atividade avaliativa final, para fechar a sequência do ensino investigativo, os resultados da proposta de classificação dos seres vivos foram apresentados por cada grupo oralmente e na forma de banner.

No Laboratório de Microscopia os alunos receberam informações acerca das

atividades de ensino e pesquisa desenvolvidas no laboratório. Após as discussões foi feita a seguinte pergunta: "*Qual a unidade básica dos seres vivos*?". Mais uma vez foram observadas as percepções prévias dos alunos sobre o assunto. Após a contextualização os professores apresentaram aos alunos no microscópio lâminas com exemplares de tecido animal e vegetal, o que permitiu a observação das células. Após a visualização do material no microscópio os alunos realizaram desenhos das células animal e vegetal. Ao final foi realizada uma roda de conversa para dialogar sobre as características do material e a importância das pesquisas científicas utilizando esse tipo de material.

Na segunda etapa que ocorreu na escola, as atividades de pesquisa foram desenvolvidas pelos alunos. Nessa etapa os alunos receberam a informação de que naquele momento eles atuariam como cientistas na busca por respostas às questões apresentadas. Novamente foi apresentado aos alunos a sequência investigativa (Pergunta/Problema, Sistematização do conhecimento construído, Contextualização do conhecimento no dia a dia dos alunos e Atividade avaliativa final).

A primeira pergunta/problema apresentada pelos professores na escola foi: "*Você conhece os insetos*?". A seguir foi discutido com os alunos, que embora grande parte da diversidade biológica seja conhecida e esteja classificada, muitos seres vivos, apesar de abundantes, são desconhecidos na população de maneira geral.

Os alunos se organizaram em grupos sob orientação de monitores (acadêmicos da UFMS e professores). Após rodas de conversas e levantamento dos conhecimentos prévios dos alunos, os grupos apresentaram as seguintes questões a serem investigadas: 1) Por que as abelhas são importantes para o meio ambiente? 2) Se todos são insetos por que as cabeças são diferentes? 3) Formigas evitam humanos? 4) Você conhece a formiga-leão? 5) A diversidade de formigas muda em um ambiente com sol e outro com sombra?

Cada grupo sob a orientação de um monitor realizou pesquisas em livros, jornais e revistas disponíveis na escola. E ainda, na sala de informática da escola buscaram vídeos de acesso gratuito na Internet. Neste momento buscou-se ter a investigação como uma ação principal na busca da resolução de um problema apresentado. Os resultados dos projetos desenvolvidos foram apresentados na Feira de Ciências da Escola (mês de setembro, de acordo com o calendário escolar). As apresentações ocorreram oralmente através da apresentação de banners e maquetes.

3 I RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante as atividades realizadas neste projeto os alunos mostraram-se bastante participativos fazendo questionamentos e comentários. Dado o fato de os assuntos apresentados terem sido tratados sempre buscando-se uma aproximação com o cotidiano dos alunos, as atividades despertaram um maior interesse e curiosidade a respeito do assunto proposto. A sequência seguida nas atividades, tais como propor uma pergunta,

estimular a busca por resposta (por meio da leitura, vídeos e observação de elementos vinculados ao tema da aula), discutir sobre o tema e a produção autoral dos resultados, gerou além de curiosidade, uma motivação e engajamento do grupo para seguir os passos da atividade proposta (Figura 1).

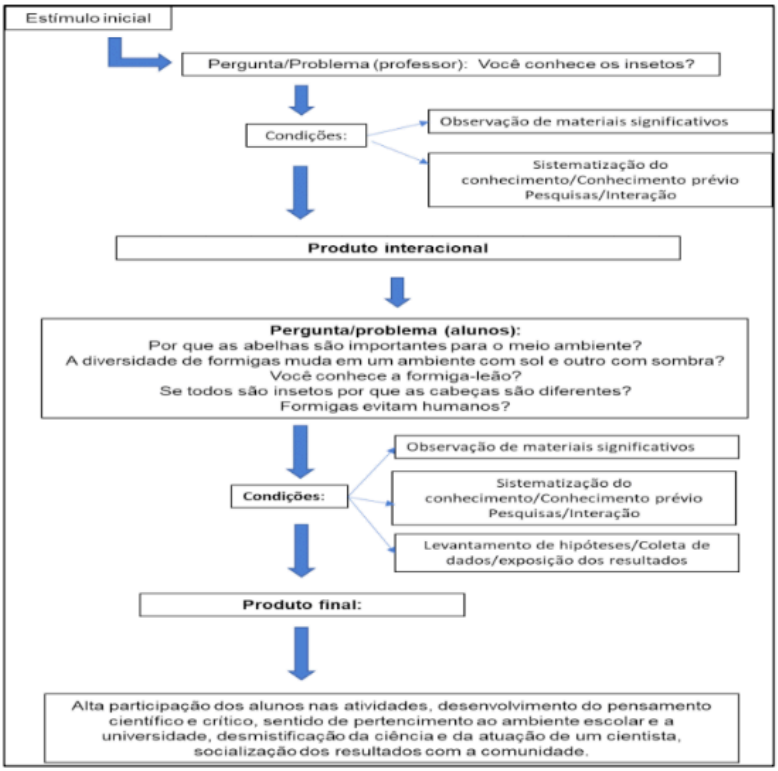


Figura 1. Sequência de atividades desenvolvidas no projeto Cientista na Escola dentro de uma perspectiva do ensino por investigação.

As atividades experimentais favorecem a aprendizagem, pois motivam os alunos e os envolvem nos temas trabalhados, favorecendo a compreensão e interpretação de fenômenos do dia a dia (LEITE *et al.*, 2005; KRASILCHIK 2004). A ideia de colocar os alunos para observar a atuação de um cientista na universidade e na sequência eles próprios desenvolverem seus projetos contribuiu para a democratização do acesso ao conhecimento. A experiência no campus ressaltou também o redimensionamento da função social da própria universidade, que é a de contribuir na busca de soluções para os graves problemas sociais da população, formulando políticas públicas participativas e emancipadoras.

O encontro com os professores universitários que se apresentaram aos alunos como cientistas ajudou na desmistificação do que é um cientista e como ele atua no

desenvolvimento de suas pesquisas. A aproximação entre a ciência e o trabalho de um cientista apenas com uma definição conceitual, sem saber como se dá a ciência por vezes causa muitas dúvidas e confusões (KOSMINSKY e GIORDAN, 2002). A aproximação dos alunos ao ambiente de trabalho de um cientista colabora na construção de elementos, que possibilitam compreender aspectos da linguagem, estrutura e função social da ciência.

Ao observar os organismos da coleção zoológica os alunos demonstraram surpresa ao perceber a variedade de exemplares coletados na região. Durante a contextualização os alunos participaram ativamente por meio de perguntas relacionadas a ocorrência dos seres vivos observados e sua importância para os ecossistemas. Nesse momento os professores chamaram atenção de como os projetos desenvolvidos na universidade são importantes para o conhecimento da fauna da região e como esses dados podem ser utilizadas na conservação das espécies e dos ecossistemas como um todo. Ou seja, todas as discussões caminharam de maneira a possibilitar um caminho para discussões mais complexas como as implicações entre Ciência e Sociedade, que possibilita o exercício da cidadania.

Os alunos discutiram sobre a classificação dos seres vivos, levando hipóteses dos porquês de cada ser vivo estar dentro de uma classificação (insetos, peixes, répteis, anfíbios e mamíferos). A pergunta simples: Por que os peixes são peixes? Quando foi feita observando os organismos, permitiu aos alunos explorar suas respostas de maneira significativa, bem como recorrer ao repertório particular de cada um, seja pelas experiências pessoais ou mesmo escolares. Ao propor modelos de classificação dos seres vivos os alunos elencaram as características visuais que eles observaram nas amostras, bem como o conhecimento prévio que eles traziam das aulas de ciências. Por exemplo, na classificação dos peixes foram apresentadas características como: são animais vertebrados e possuem nadadeira. Para classificar os répteis foram utilizadas características como vertebrados e pele coberta por escamas (Figura 2).

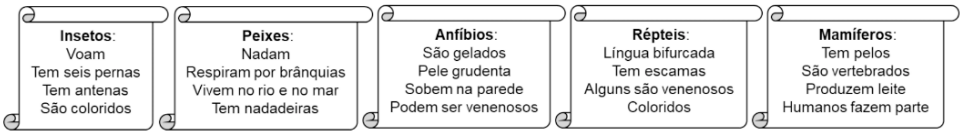


Figura 2. Proposta de Classificação dos seres vivos desenvolvidas por alunos do Ensino Fundamental II (6º e 7º ano) após observação de uma coleção zoológica.

Nas atividades desenvolvidas no laboratório de microscopia foram perceptíveis o interesse, a curiosidade e o entusiasmo dos estudantes em visualizar uma célula real utilizando um equipamento que a maioria deles nunca teve contato. Tal aspecto reforça a importância de demonstrar aos alunos como o ensino pode ser belo, envolvente e significativo em suas vidas. Ao possibilitar tal tipo de atividade a escola atua como reflexo das mudanças que ocorrem na sociedade, tanto no âmbito político, econômico, social e

cultural. Ou seja, cumpre o seu papel estabelecido na LDB, o qual foi apresentado na introdução deste trabalho, de formação de cidadãos sensibilizados e críticos (BRASIL, 1996).

Atividades práticas que proporcionam a interação entre o aluno e materiais concretos, como livros, microscópio, modelos didáticos, maquetes etc. estabelecem relações que irão abrir possibilidades de atingir novos conhecimentos (Andrade e Massabni 2011). Esse tipo de atividade ao ser utilizada nas aulas de Ciências ajuda no melhor aprendizado dos conteúdos teóricos trabalhados em sala de aula, estabelecendo-se o diálogo entre teoria e prática. E ainda, tratar de forma contextualizada temas cotidianos ligados a fenômenos naturais de forma leve e prazerosa contribui para que ocorra a aprendizagem crítica e significativa (BARBOSA et al., 2021; Bartzik e Zander, 2016).

Na segunda etapa deste projeto, desenvolvida na escola, na sistematização e contextualização do tema proposto (Você conhece os insetos?), os monitores apresentaram a questão a ser pesquisada por meio de textos, vídeos e amostras da coleção zoológica da universidade. Cada grupo desenvolveu uma metodologia de pesquisa na busca por seus resultados. Por exemplo, o grupo que pesquisou “Por que as abelhas são importantes para o meio ambiente?” realizou atividades como: observação das abelhas que ocorrem no entorno da escola, coleta das abelhas com uso de puçá (tipo de rede para coleta), observação dos aspectos da morfologia das abelhas em estereomicroscópio, montagem de maquete para apresentar a relação entre as abelhas e as flores e o mecanismo da polinização. No Quadro 1 está apresentada a descrição das atividades realizadas pelos grupos.

Questão investigada pelos alunos	**Atividades desenvolvidas**
Por que as abelhas são importantes para o meio ambiente?	Pesquisas em revistas, livro didático e vídeos; Coleta de abelhas no entorno da escola com o uso do puçá (tipo de rede para coleta); Confecção de caixas entomológicas próprias para esse tipo de estudo; Observação de aspectos da morfologia das abelhas no estereomicroscópio; Elaboração de maquete para apresentar a relação entre as abelhas e as flores e o mecanismo da polinização.
Se todos são insetos por que as cabeças são diferentes?	Pesquisas em revistas, livro didático e vídeos; Coleta de insetos no pátio da escola com o uso de armadilhas de queda; Confecção de caixas entomológicas próprias para esse tipo de estudo; Observação de aspectos da morfologia da cabeça dos insetos no estereomicroscópio; Elaboração de maquete destacando a cabeça dos insetos.
Formigas evitam humanos?	Pesquisas em revistas, livro didático e vídeos; Coleta, no pátio da escola, de formigas em áreas próximas a circulação de pessoas e em áreas afastadas da circulação de pessoas; Confecção de caixas entomológicas próprias para esse tipo de estudo; Observação de aspectos da morfologia das formigas no estereomicroscópio; Elaboração de maquete destacando a organização social das formigas.

Você conhece a formiga-leão?	Pesquisas em revistas, livro didático e vídeos; Observação das formigas-leão provenientes da coleção zoológica da UFMS; Confecção de caixas entomológicas próprias para esse tipo de estudo; Observação de aspectos da morfologia das formigas-leão no estereomicroscópio; Elaboração de maquete destacando o ciclo de vida das formigas-leão.
A diversidade de formigas muda em um ambiente com Sol e outro com sombra?	Pesquisas em revistas, livro didático e vídeos; Coleta de formigas no pátio da escola em áreas com Sol e sem Sol; Confecção de caixas entomológicas próprias para esse tipo de estudo; Observação de aspectos da morfologia das formigas no estereomicroscópio; Elaboração de maquete destacando a morfologia das formigas.

Quadro 1. Atividades desenvolvidas por alunos do Ensino Fundamental II no Projeto de Extensão Cientista na Escola.

A apresentação final realizada tanto no laboratório, quanto na Feira de Ciências, permitiu aos alunos apresentar o que eles construíram, por meio das observações, discussões, levantamento de hipóteses e conclusões finais. O que de maneira geral causou entusiasmo nos alunos, pela apropriação dos conhecimentos e pelo protagonismo dos mesmos durante o processo. Esse processo vai de encontro com o desenvolvimento de uma aula investigativa, na qual o professor atua como um mediador que estimula a busca pela resposta, propõe desafios, valoriza o conhecimento prévio dos estudantes e conduz os alunos para uma reflexão na busca de explicações que os levem às possíveis respostas do problema apresentado (AZEVEDO et al., 2018; CARVALHO, 2013).

Atividades no ambiente escolar focadas na busca por resolução de problemas da comunidade, dentro das bases de uma pesquisa científica, podem gerar resolução de problemas do cotidiano, de maneira a aproximar o trabalho de um aluno ao ambiente escolar e a sua comunidade como um todo (amigos da escola, vizinhos, pais etc.) (Figuras 3).

Figura 3. (A) Visão geral da apresentação dos trabalhos na Feira de Ciências. (B) Maquete montada para representação das formigas. (B) Caixa entomológica confeccionada para armazenamento das abelhas coletadas.

Fonte: os autores

Quando uma situação problema é apresentada na sala de aula e os alunos têm a oportunidade de buscar as respostas para sanar suas curiosidades, o processo de ensino e aprendizagem torna-se mais participativo. A Base Nacional Comum Curricular

(BRASIL, 2017) traz diversos desafios, entre eles, incluir mais investigação no processo de aprendizagem, trabalhar o letramento científico e propor uma progressão de aprendizagem com habilidades. Nessa perspectiva, é importante a aproximação gradativa aos principais processos, práticas e procedimentos da investigação científica.

Os alunos do Ensino Fundamental II trazem conhecimento sobre os animais, as plantas, o funcionamento do corpo etc. Neste projeto foi observado que as atividades que relacionam esse conhecimento adquirido com situações reais do meio onde esses alunos estão inseridos, propiciam e incentivam o gosto pela disciplina Ciências e pelas áreas que ela envolve. Embora a escola tenha a responsabilidade de propiciar um modelo de educação de qualidade para seus alunos, as universidades com seus projetos de extensão podem contribuir com esse processo. O que além de somar para um ensino de qualidade, colabora com a construção de uma sociedade mais justa e crítica.

4 I CONSIDERAÇÕES FINAIS

O projeto de extensão Cientista na Escola promoveu a integração entre a comunidade e a universidade, o que possibilitou uma transformação da realidade educacional dos alunos envolvidos neste projeto. Ao apresentar o trabalho de um cientista para os alunos cumpriu-se o papel de desmistificação da Ciência e de valorização das universidades como centros de desenvolvimentos de pesquisas voltadas para a comunidade. Nota-se que a universidade possui um grande potencial de transformação social e pode ser compreendida como um ambiente de formação de profissionais cidadãos, com capacidade de construir atividades voltadas para melhorias da qualidade de vida da sociedade.

O modelo de sequência didática focada no ensino por investigação despertou nos alunos curiosidade na busca por respostas para os problemas apresentados e ainda lhes permitiu se visualizarem na situação de gerar respostas por meio de suas pesquisas. As atividades desenvolvidas neste projeto mostram caminhos para formar cidadãos capazes de ir além da mera reprodução de conteúdo, sendo capazes de refletir e transformar suas realidades pelo pensamento científico e crítico.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, M. L. F; MASSABNI, V. G. **O desenvolvimento de atividades práticas na escola: Um desafio para professores de Ciências**. Ciência & Educação, Bauru, v.17, n.4, p. 835-854, 2011.

AZEVEDO, M. N.; ABIB, M. L. V. S.; TESTONI, L. A. **Research activities of teaching: mediation between teaching, learning and teaching training in Sciences**. Ciência e Educação, Bauru, v. 24, n. 2, p. 319-335, 2018

BRASIL. Lei nº 4024/1961, de 20 de dezembro de 1961 **- Diretrizes e Bases da Educação Nacional**. Brasília, 1961.

BRASIL. Lei nº 5692/1971, de 11 de agosto de 1971 - **Diretrizes e Bases da Educação Nacional**. Brasília, 1971

BRASIL. Constituição – **Constituição da República Federativa do Brasil**. Brasília: Senado Federal. 1988.

BRASIL. 1996. Lei nº 9.394 de 20/12/1996. **Lei de diretrizes e bases da Educação (LDB)**. Brasília, 1996.

BARTZIK, F.; ZANDER, L. D. **A Importância Das Aulas Práticas De Ciências No Ensino Fundamental**. Revista @rquivo Brasileiro de Educação, Belo Horizonte, v.4, n. 8, 2016.

BRASIL. Ministério da Educação. **Base Nacional Comum Curricular**. Brasília, 2017.

BARBOSA, S. A.; NUNES, V. L. N. D.; FERREIRA, D. S. **Contextualizando com o lúdico e experimentos de ciências no 9º ano do Ensino Fundamental da Escola Municipal Unidade de Ensino Básico Rubens Almeida**. In: Práticas Experimentais para o Ensino de Ciências: Construindo Alternativas Adequadas à Realidade Brasileira. Pinto, J. A.; PEDRSO, L. S. (org.). Curitiba, Bagai, 1 ed. 2021. 161 p.

DCN 2013. Resolução nº 4 de 13 de julho de 2010. **Diretrizes Curriculares Nacionais Gerais da Educação Básica**. Ministério da Educação. Secretária de Educação Básica. Diretoria de Currículos e Educação Integral. Brasília: MEC, SEB, DICEI, 2013.

CARVALHO, A. M. P. (Org.). 2004**. Ensino de Ciências: unindo a pesquisa e a prática**. São Paulo: Editora Thompson. 165 p.

CARVALHO, A. M. P. (Org.). 2013. **Ensino de Ciências por Investigação: condições para implementação em sala de aula**. São Paulo: Cengage Learning. 152 p.

HODSON, D. **Hacia un enfoque más critico del trabajo de laboratorio**. Enseñanza de lãs Ciencias, Vigo, v. 12, n. 3, p. 299-313, 1994.

KRASILCHIK, M. **Práticas de ensino de biologia**. 4. ed. São Paulo: EDUSP, 2004. 200 p.

LEITE, A. C. S.; SILVA, P. A. B.; VAZ, A. C. R. **A importância das aulas práticas para alunos jovens e adultos: uma abordagem investigativa sobre a percepção dos alunos do PROEF II**. Revista Ensaio. Minas Gerais, v. 7, n. especial, 2005.

LIMA, M. E. C. C.; MAUÉS, E. R. C. **Uma releitura do papel da professora das séries iniciais no desenvolvimento e aprendizagem de ciências das crianças**. Ensaio – Pesquisa em Educação em Ciências, v. 8, p. 161-175, 2006.

KOSMINSKY, L.; GIORDAN, M. **Visões de ciências e sobre cientista entre estudantes de Ensino Médio**. Química Nova na Escola, São Paulo, n. 15, p. 11-18, 2002.

SASSERON, L. H.; CARVALHO, A. M. P. de. **Almejando a alfabetização científica no Ensino Fundamental: a proposição e a procura de indicadores do processo**. Investigações em Ensino de Ciências, Porto Alegre, v. 13(3), n. 3, p. 333-352, 2008.

CAPÍTULO 17

REPROGRAMAÇÕES METABÓLICAS EM MELANOMAS RESISTENTES AO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO

Data de aceite: 26/05/2021
Data de submissão: 08/03/2021

Camila Kehl Dias
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Bioquímica, Laboratório de Bioquímica Celular
Porto Alegre - RS
http://lattes.cnpq.br/2701318858333475

Ivi Juliana Bristot
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Bioquímica, Laboratório de Bioquímica Celular
Porto Alegre - RS
http://lattes.cnpq.br/2707063407481261

Fábio Klamt
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Bioquímica, Laboratório de Bioquímica Celular
Porto Alegre - RS
http://lattes.cnpq.br/3256932358053453

RESUMO: Tem sido amplamente discutido que o melanoma, um dos tipos mais letais de câncer, pode adaptar temporariamente seu fenótipo após ciclos de tratamento quimioterápico ou devido à pressão microambiental para um fenótipo que apresenta maior resistência ao tratamento e se torna mais invasivo. Os dados disponíveis sugerem que processos recorrentes de reprogramação metabólica estão ativos em células resistentes que são dependentes do metabolismo mitocondrial, apresentando alterações na sua morfologia e dinâmica. Por um lado, há um fenótipo glicolítico baseado no efeito Warburg, caracterizado por células fermentadoras e com alta proliferação. Por outro lado, existe um fenótipo mais oxidativo, onde a principal fonte de produção de ATP é a fosforilação oxidativa mitocondrial. Este fenótipo pode ser representado por células com taxas de divisão lenta (também chamadas de células *slow-cycling*) e alta expressão do fator epigenético JARID1B (enzima histona lisina demetilase) e o regulador mestre da diferenciação de melanócitos (MITF). Aqui, revisamos aspectos da reprogramação metabólica do câncer, com foco no melanoma, e sua relação com a resistência à quimioterapia.

PALAVRAS-CHAVE: Melanoma, adaptação metabólica, mitocôndria, OXPHOS, quimio-resistência.

METABOLIC REPROGRAMMING IN MELANOMA CHEMOTHERAPY-RESISTANT CELLS

ABSTRACT: It has been widely discussed that melanoma, one of the most lethal types of cancer, can temporarily adapt its phenotype after cycles of chemotherapy or due to micro-environmental pressure for a phenotype that is more resistant to treatment and becomes more invasive. The available data suggests that recurrent metabolic reprogramming processes are active in resistant cells, which are dependent on mitochondrial metabolism, with changes in their morphology and dynamics. On the one hand, there is a glycolytic phenotype based on the Warburg effect, characterized by fermenting cells with

high proliferation. On the other hand, there is a more oxidative phenotype, where the main source of ATP production is mitochondrial oxidative phosphorylation. This phenotype can be represented by cells with slow division rates (also called slow-cycling cells) and high expression of the epigenetic factor JARID1B (histone lysine demethylase) and of the master regulator of melanocyte differentiation (MITF). Here, we review aspects of metabolic reprogramming in cancer, with a focus on melanoma, and its relationship with resistance to chemotherapy.
KEYWORDS: Melanoma, metabolic adaptation, mitochondria, OXPHOS, chemotherapy-resistance.

1 I INTRODUÇÃO

O melanoma é a forma de câncer de pele mais agressiva. Originada dos melanócitos, células responsáveis pela produção de melanina e derivadas da crista neural, que são encontradas principalmente na camada basal da epiderme e nos folículos capilares (LEONARDI *et al.*, 2018). O risco de desenvolvimento desta neoplasia é predominantemente ambiental, estando geralmente associado à exposição crônica da pele ao sol. O melanoma possui alta capacidade metastática e aproximadamente 10% dos pacientes são diagnosticados já no estágio avançado, o que implica em baixas taxas de sobrevida (LEONARDI *et al.*, 2018). Por isso há a necessidade de amplas campanhas de conscientização da população para estímulo do autoexame de pele, conhecido como ABCD, que busca a presença de nevos com ***A***ssimetria, ***B***ordas irregulares, heterogeneidade de ***C***ores e com crescimento ***D***inâmico (SHAIN; BASTIAN, 2016).

Devido à eficiência limitada das quimioterapias convencionais, alguns biomarcadores vêm sendo utilizados para determinar a elegibilidade do paciente para tratamentos direcionados. As principais mutações genéticas presentes em melanomas estão relacionadas aos proto-oncogenes BRAF (B-Raf), NF1 (Neurofibromina 1) e NRAS (N-Ras), que resultam em células adictas à via de sinalização MAPK (RAF/MEK/ERK) (LEONARDI *et al.*, 2018). Em pacientes com a expressão do oncogene BRAF, que representa 37 a 50% dos casos, de melanoma portadores de uma mutação somática (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007). Foi demonstrado que os inibidores de BRAF, dabrafenibe (GSK2118436) ou vemurafenibe (PLX4032), e o inibidor de MEK, trametinibe (GSK1120212), em terapia combinada, melhoraram a sobrevida geral de pacientes de melanoma. No entanto, a regressão tumoral inicial é sucedida por uma recidiva rápida do tumor causada pela sobrevivência (e seleção) de células tumorais residuais com resistência à droga (SULLIVAN; FLAHERTY, 2013). Logo, a identificação dos mecanismos subjacentes de resistência à medicamentos tem sido foco de intensa pesquisa a nos últimos anos.

Surpreendentemente, as adaptações metabólicas nessas células cancerosas que são responsáveis pela recidiva do tumor não segue a concepção clássica do fenótipo celular dependente de altas taxas glicolíticas como principal fonte de energia, também conhecido como Efeito Warburg (CANTOR; SABATINI, 2012; VOGEL *et al.*, 2019).

Portanto, é amplamente aceito que as mutações em BRAF levam à uma reprogramação do metabolismo das células de melanoma de glicolíticas (fermentadoras) para oxidativas (dependentes da atividade da mitocôndria); e como consequência, os inibidores de BRAF também alteram profundamente o metabolismo dessas células (HAQ *et al.*, 2013; ROESCH *et al.*, 2013). Assim, este capítulo discutirá os processos de adaptação bioenergética relacionadas à resistência do melanoma, à terapia alvo e sua capacidade de desafiar o Efeito Warburg, apresentando um metabolismo oxidativo e dependente da mitocôndria.

2 | METABOLISMO ENERGÉTICO DO MELANOMA

Há quase um século, o bioquímico alemão Otto Warburg propôs que a dependência das células neoplásicas pela glicólise para obtenção de energia era causada por uma suposta disfunção mitocondrial. Estudos subsequentes mostraram que as células tumorais podem usar a respiração mitocondrial, entretanto há uma preferência metabólica por converter glicose em lactato, mesmo na presença de oxigênio, um fenômeno cunhado como glicólise aeróbica ou Efeito Warburg. Embora a glicólise produza uma menor quantidade de moles de ATP por mol de glicose, quando comparada com o processo de fosforilação oxidativa, esta via metabólica também permite o fornecimento de biomassa (na forma de derivados de carbono) para a biossíntese de macromoléculas, fundamentais para suportar a alta taxa de proliferação celular. Assim, a alta atividade da via glicolítica é responsável pela alta atividade mitótica de células cancerosas (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Além disso, essa rota metabólica, juntamente com a via das pentoses fosfato (PPP), recicla os níveis de NADPH, que é fundamental para fornecer poder redutor essencial para os processos anabólicos necessários para sustentar essa alta replicação celular.

Por conseguinte, as células de melanoma com a mutação $BRAF^{V600E}$ apresentam níveis elevados do fator de transcrição induzido por hipóxia 1 alfa (HIF1α), molécula classicamente descrita por induzir a transcrição de genes envolvidos com proliferação, sobrevivência celular e metabolismo da glicose, principalmente pela hiperativação da via MAPK (Fig. 1a) (HAQ *et al.*, 2013; MARCHETTI *et al.*, 2018; YEUNG; PAN; LEE, 2008). Essa hiperativação não é exclusiva das células que contêm mutações BRAF, visto que até 90% dos melanomas apresentam um estado de ativação aberrante da via MAPK (LEONARDI et al., 2018). A enzima piruvato desidrogenase cinase (PDK), que é um dos alvos de HIF1α, contribui para a baixa atividade mitocondrial no melanoma. A PDK controla a utilização de carbono da glicose no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) via inibição da enzima piruvato desidrogenase (PDH). Essa inibição resulta em altos níveis de lactato sérico observados em pacientes de melanoma com mutação para BRAF (HAQ *et al.*, 2013; RATNIKOV, B. I. *et al.*, 2017). Também foi identificado no melanoma o aumento na expressão dos transportadores de glicose, bem como de vários genes glicolíticos, resultando em fenótipo classicamente Warburg devido à ativação aberrante da via MAPK (THEODOSAKIS *et al.*, 2015).

Esse fenômeno (hiperativação da via glicolítica) é tão pronunciado que pode ser utilizado para diagnóstico de áreas tumorais em imagens obtidas por tomografia por emissão de pósitrons/tomografia computadorizada com fluoro-deoxi-glicose (FDG-PET/CT). Assim, se identifica *in vivo* a enorme captação de glicose em diferentes tipos de câncer, quando comparada ao tecido saudável. Em melanoma, as imagens FDG-PET/CT de pacientes após o tratamento com inibidores BRAF e MEK mostram uma diminuição substancial na captação de FDG (SCHMITT *et al.*, 2018).

Alterações metabólicas no melanoma se estendem além da glicólise aeróbica; essas células também podem se tornar dependentes da glutamina, independentemente do histórico oncogênico (RATNIKOV *et al.*, 2015). A oncoproteína c-Myc regula positivamente a enzima glutaminase (GLS), que catalisa a conversão de glutamina em glutamato não apenas para abastecer o ciclo do TCA, mas também para induzir a biossíntese de prolina a partir da glutamina (LIU *et al.*, 2012). Além disso, foi demonstrado que células $BRAF^{V600E}$ apresentam ativação de Oct-1 (POU classe 2 *homeobox* 1) para promover a regulação positiva das enzimas mitocondriais cetogênicas 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintase 1 e liase (HMGCS1 e HMGCL, respectivamente), evidenciando um importante papel da cetogênese no câncer (Fig. 1a). A ativação de Oct1 aumenta os níveis intracelulares de aminoácidos e, especificamente, promove a ligação de $BRAF^{V600E}$ a MEK1 e, subsequentemente, a fosforilação de MEK1 (KANG *et al.*, 2015). Além disso, Oct-1 diminui o metabolismo mitocondrial através da inibição do fator de transcrição PGC1α (coativador de receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma 1), reforçando o Efeito Warburg (GIRNUN, 2012). O estado anabólico também é sustentado evitando a ativação da proteína cinase ativada por AMP (AMPK), um sensor essencial nas vias de estresse energético celular, que estimula a produção de ATP nas vias catabólicas. Em células $BRAF^{V600E}$, a serina/treonina cinase LKB, que fosforila e ativa diretamente a AMPK, é inibida pela atividade de ERK, favorecendo o uso de recursos energéticos por vias anaeróbias (ZHENG *et al.*, 2009).

3 I MECANISMOS METABÓLICOS NO PROCESSO DE RESISTÊNCIA DO MELANOMA

Recentemente, muitos estudos relataram uma adaptação metabólica em resposta ao tratamento com inibidores BRAF/MEK/ERK relacionado a um aumento nas taxas metabólicas mitocondriais, o que leva à recorrência da doença (HAQ *et al.*, 2013; LEBLEU *et al.*, 2014; NAKAGAWA *et al.*, 2016; VOGEL *et al.*, 2019). Clinicamente, o aumento da expressão de genes relacionados à rede de biogênese mitocondrial foi observado em duas coortes independentes, tendo sido associadas a pior sobrevida geral de pacientes com melanoma (ZHANG *et al.*, 2016). A literatura apresenta indícios que a resistência à drogas, caracterizada por alto metabolismo oxidativo mitocondrial (OXPHOS, fosforilação oxidativa), pode estar relacionada a dois estados de diferenciação: (1) um fenótipo desdiferenciado

comumente caracterizado pela alta expressão da enzima histona lisina demetilase (KDM) JARID1B e baixa expressão do fator de transcrição indutor de melanócitos (MITF); ou (2) um fenótipo diferenciado caracterizado por alta expressão de MITF e de PGC1α. Delgado-Goñi e colegas demonstraram que a reativação do metabolismo mitocondrial durante o tratamento com vemurafenibe não é uniforme. Em seu estudo, a inibição de BRAF deu origem a três clones de células de melanoma com diminuição do consumo de glicose; um com metabolismo OXPHOS por meio da atividade anaplerótica da enzima piruvato carboxilase; os outros dois clones se redirecionaram para o metabolismo lipídico e aumentaram a síntese de prostaglandina E2, sendo mais responsivos ao inibidor BRAF quando co-tratados com um inibidor de EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico). Isso indica a importância do metabolismo lipídico e das vias EGFR na reativação de ERK nessas células (DELGADO-GOÑI *et al.*, 2019).

Os melanomas com JARID1B^{alto} são intrinsecamente resistentes à quimioterapia. Este fenótipo ocorre espontaneamente em baixa frequência na massa tumoral, mas a porcentagem desta subpopulação pode aumentar sob tratamentos como cisplatina, vemurafenibe ou temozolamida (ROESCH *et al.*, 2013). O perfil proteômico desse fenótipo revelou a regulação positiva de vários membros da cadeia transportadora de elétrons (CTE), como a NADH desidrogenase (Complexo I), ubiquinol citocromo *c* redutase (Complexo III), citocromo *c* oxidase (Complexo IV) e ATP sintase; assim com a regulação negativa de enzimas glicolíticas, como a hexoquinase I (HK1) e 2 (HK2) (ROESCH *et al.*, 2013). Nesse sentido, as células com superexpressão de JARID1B apresentam OXPHOS alta (Fig. 1b), dependente de glicose, glutamina e ácidos graxos, apresentando níveis intracelulares elevados de substratos da β-oxidação, concomitantemente a níveis reduzidos de lactato (HAQ *et al.*, 2013; VOGEL *et al.*, 2019).

Outro programa metabólico adaptativo que limita a eficácia dos inibidores de BRAF ocorre ao ativar o fator de transcrição MITF, que se transloca para o núcleo e ativa a expressão de PGC1α (VAZQUEZ *et al.*, 2013). Esse fenótipo também parece ser um fator chave no processo de metástase, uma vez que as células cancerosas circulantes apresentaram dependência da expressão elevada de PGC1α para desenvolver um potencial invasivo (LEBLEU *et al.*, 2014). Clinicamente, as biópsias de pacientes tratados com inibidores de BRAF mostraram expressão aumentada de MITF (HAQ *et al.*, 2013).

A reconexão metabólica em células de melanoma resistentes a inibidores de BRAF também é promovida pelo microRNA miR-211. Embora seja um alvo transcricional do MITF e haja uma correlação positiva de suas expressões, a atividade do miR-211 não é necessariamente devida ao MITF (DÍAZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2018). Mazar e colaboradores demonstraram que a expressão ectópica de miR-211 regula a respiração mitocondrial, aumentando a conversão de piruvato a acetil-CoA para alimentar o ciclo de TCA na linhagem celular A375 pela regulação negativa de PDK4 (MAZAR *et al.*, 2016). Como esperado, ocorre um aumento na taxa de consumo de oxigênio (OCR, do inglês *oxygen consumption*

rate), de intermediários TCA (citrato, a-ceto-glutarato, succinato, fumarato e malato), de expressão dos complexos respiratórios e diminuição da razão $NADP^+$/NADPH (SAHOO *et al.*, 2019). Em contraste, a deficiência de miR-211 induzida pela deleção via CRISPR/Cas9 diminuiu a OCR sem modificar a taxa de acidificação extracelular ou massa mitocondrial (SAHOO *et al.*, 2019). Além disso, a deficiência de miR-211 diminuiu a capacidade de reserva respiratória, que é descrita como a capacidade de aumentar a transferência de elétrons pela CTE de acordo com a demanda de energia, sugerindo um comprometimento da capacidade de responder ao estresse bioenergético. É importante ressaltar que a deleção do miR-211 promove a sensibilidade de células de melanoma ao medicamento vemurafenibe (SAHOO *et al.*, 2019).

Como os tratamentos com inibidores de BRAF causam estresse celular, a autofagia foi descrita como um dos processos adaptativos em células resistentes (MARTIN *et al.*, 2017). Recentemente, foi descrito que alta expressão de MITF e miR-211 sustenta um sistema de amplificação da autofagia sob inibição de mTOR por inanição ou tratamento com Torin-1 (OZTURK *et al.*, 2019). Neste contexto, o MITF pode se translocar para o núcleo para ativar alvos relacionados à autofagia, bem como miR-211. Curiosamente, miR-211 reforça o processo autofágico ao diminuir o sinal de mTOR, estimulando a localização nuclear de MITF, bem como o regulador mestre de genes da biogênese lisossomal TFEB (fator de transcrição EB) (OZTURK *et al.*, 2019). A secreção de ATP mediada pela autofagia foi observada em células resistentes ao inibidor de BRAF e confirmada por *knockdown* de genes de autofagia, que atenuaram os níveis de ATP extracelular (eATP) (MARTIN *et al.*, 2017). Este eATP, por sua vez, é captado por meio do receptor purinérgico P2RX7, promovendo vias de invasão.

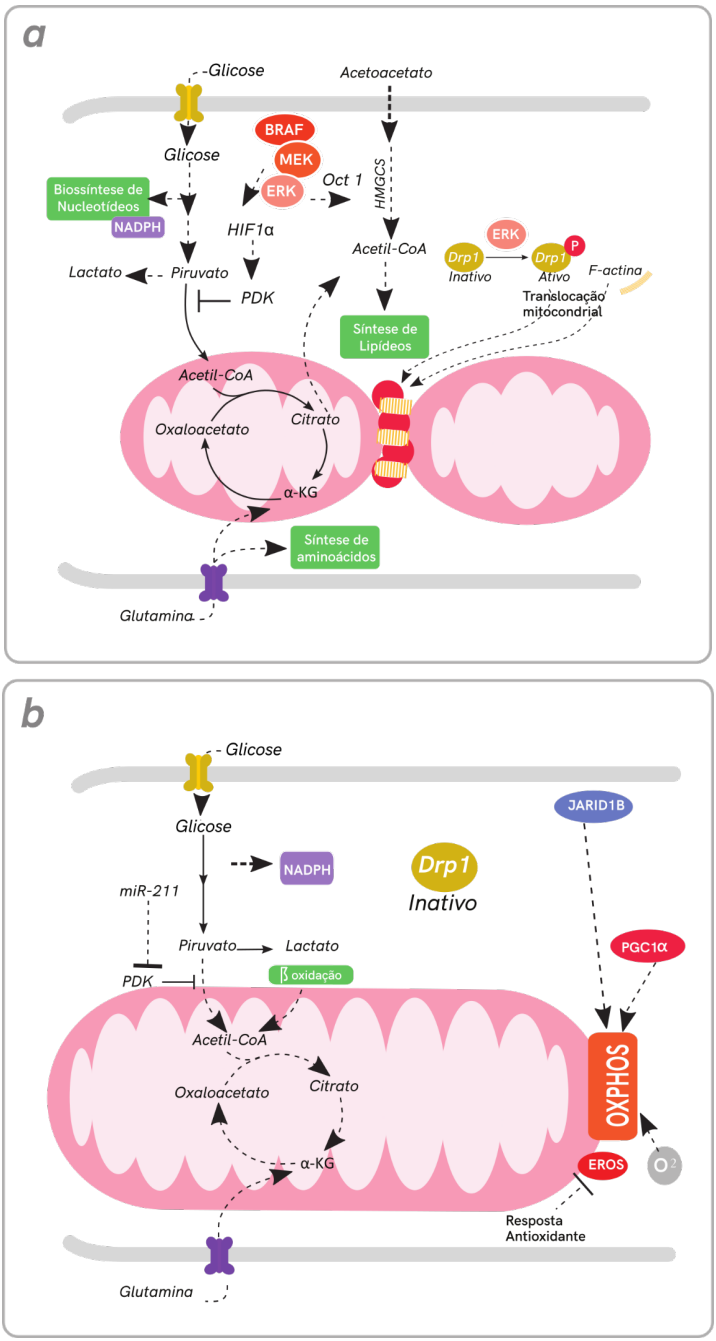


Figura 1: Esquematização de vias metabólicas que estão diferencialmente ativadas e inibidas nos diferentes fenótipos celulares em melanoma (a) células glicolíticas, onde há redirecionamento de carbono para as vias anapleróticas e, concomitantemente processos de fissão mitocondrial. (b) Células com metabolismo altamente oxidativo, que utilizam maior parte do carbono para oxidação total até CO_2, havendo alta produção de EROS e processos ativos de fusão mitocondrial.

4 | ESTRESSE OXIDATIVO, RESPOSTA ANTIOXIDANTE E MICROAMBIENTE ÁCIDO

O alto nível de estresse oxidativo devido a atividade mitocondrial é uma das características das células de melanoma resistentes, já que a maioria das EROs (espécies reativas de oxigênio) celulares são subproduto da respiração mitocondrial (CIERLITZA *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2016). O nível de malondialdeído, um biomarcador de peroxidação lipídica dependente de EROs, encontra-se elevado no plasma de pacientes após um mês de tratamento com vemurafenibe (CORAZAO-ROZAS *et al.*, 2013). Embora EROs promovam muitos aspectos do desenvolvimento e progressão tumorais, a ativação do sistema de defesa antioxidante é uma estratégia das células tumorais para modular e controlar sua ação (Fig. 1b). O subconjunto de células $MITF^{alto}/PGC1\alpha^{alto}$ tem níveis aumentados da enzima superóxido dismutase mitocondrial (SOD2), e sua presença na membrana mitocondrial interna permite a dismutação imediata de ânions superóxido, produzidos pela atividade da OXPHOS, em peróxido de hidrogênio (VAZQUEZ *et al.*, 2013). Essas células também apresentam regulação positiva do fator respiratório nuclear (NRF2), que desempenha um papel fundamental na resposta antioxidante contra o estresse oxidativo (ZHANG *et al.*, 2016). O aumento da atividade do NRF2 leva à ativação da PPP e à produção de NADPH, que está envolvido na regeneração da glutationa reduzida (GSH), alterando o potencial redox dependente da glutationa (relação GSH/GSSG) (KHAMARI *et al.*, 2018). Consequentemente, essas rotas protegem as células resistentes $MITF^{alto}/PGC1\alpha^{alto}$ de sua própria alta produção de EROs por meio do aumento da atividade mitocondrial, além do estresse oxidativo induzido por moléculas como PEITC (isotiocianato de fenetil), H_2O_2, piperlongumina e vemurafenibe (VAZQUEZ *et al.*, 2013). Embora não haja nenhuma evidência clara de que o NRF2 é regulado positivamente nas células de melanoma $JARID1B^{alto}$, este fenótipo muda o uso de carbono da glicólise para um fluxo elevado através da PPP, reciclando o NADPH, que então contribui para uma capacidade antioxidante dependente de GSH aumentada (VOGEL *et al.*, 2019).

A plasticidade do melanoma permite que ele sobreviva em microambientes hostis. Sob microambiente ácido, a expressão de SOX2 é estimulada e contribui para o metabolismo OXPHOS. O *knockdown* de SOX2 em células de melanoma expostas a ambiente ácido inibe a atividade de PGC1α e aumenta a expressão de transportadores de glicose (GLUTs), HK2, PDK1 e lactato desidrogenase A (LDHA) (ANDREUCCI *et al.*, 2018). Consequentemente, foi relatado que as linhagens celulares de melanoma A375 e SK-MEL-28 adquiriram resistência à cisplatina em condições de cultura em pH baixo (6 a 7) (NOGUCHI *et al.*, 2017).

5 | DINÂMICA MITOCONDRIAL NA AGRESSIVIDADE DO MELANOMA

Ao longo dos processos de progressão do melanoma e aquisição de resistência

ao tratamento quimioterápico, as alterações metabólicas estão diretamente associadas às diferenças morfológicas encontradas nas mitocôndrias, pelos processos de fusão e fissão mitocondriais (Fig. 1) (KASHATUS *et al.*, 2015). Enquanto a hiperativação da via BRAF/MAPK/ERK induz um fenótipo altamente glicolítico no melanoma, células resistentes aos inibidores BRAF/MAPK apresentam alterações no metabolismo para um perfil de OXPHOS (HAQ *et al.*, 2013; MARCHETTI *et al.*, 2018; YEUNG; PAN; LEE, 2008).

Essa readaptação metabólica é acompanhada por uma alta expressão de PGC1α, que modula a biogênese mitocondrial (HAQ *et al.*, 2013). PGC1α se liga a muitos fatores de transcrição associados à função respiratória mitocondrial, induzindo a expressão de genes envolvidos nestes processos, ao passo que os níveis de mtDNA se mantêm. Isso é seguido por ativação da fusão mitocondrial de forma rápida na grande maioria das células (FRIEDMAN; NUNNARI, 2014; SERASINGHE *et al.*, 2018).

Um estudo sobre a relação entre a produção de melanina e a dinâmica mitocondrial mostrou que ERK tem um efeito anti-melanogênico e induz fragmentação mitocondrial pela ativação de Drp1 (proteína 1 relacionada à dinamina) (KIM *et al.*, 2014). A Drp1 é uma GTPase que regula a fissão mitocondrial, sua fosforilação na serina 616 (S616) induz ativação e translocação para a mitocôndria, enquanto a fosforilação na serina 637 (S637) inibe ambos os processos (REHKLAU *et al.*, 2017). ERK1/ERK2 podem fosforilar S616 de Drp1, e esta atividade é um pré-requisito para tumorigênese induzida por alteração de MAPK. Assim, a expressão aberrante de proteínas da via de sinalização MAPK/ERK no melanoma aumenta a expressão de Drp1 e fosforilação de S616, levando à fissão mitocondrial, enquanto diminui a OCR (KASHATUS *et al.*, 2015; SERASINGHE *et al.*, 2015). A fosforilação $Drp1^{S616}$ em nevos displásicos é um biomarcador promissor, juntamente com a mutação $BRAF^{V600E}$, para determinar quais lesões apresentam maior probabilidade de se transformar em melanoma (WIEDER *et al.*, 2015). No entanto, um exame qualitativo das mitocôndrias por microscopia eletrônica em células resistentes ao inibidor de BRAF mostrou alterações morfológicas, incluindo significativamente mais cristas com amplo espaço intracrista, quando comparadas às mitocôndrias de células sensíveis (CORAZAO-ROZAS *et al.*, 2013, 2016).

O mecanismo do recrutamento mitocondrial de Drp1, bem como sua oligomerização em torno da membrana mitocondrial externa (MME), parece ser conduzido pela polimerização da actina por estimulação da proteína INF2 (formina 2 invertida ligada ao ER) (CHAKRABARTI *et al.*, 2018). A atividade da actina na fissão mitocondrial depende de sua estabilização em sua forma filamentosa (F-actina), processo que é controlado pela proteína cofilina-1. Quando desfosforilada, a cofilina-1 se liga à F-actina e induz sua despolimerização em monômeros de actina livres (G-actina). Assim, a cofilina-1 diminui a atividade de Drp1 ao desmontar F- em G-actina, regulando negativamente a fissão mitocondrial (REHKLAU *et al.*, 2017). Uma rede mitocondrial notavelmente fusionada é uma característica nas células resistentes aos inibidores BRAF/MAPK devido à perda

da fosforilação em S616 de Drp1, enquanto em células sensíveis sua atividade causa fragmentação mitocondrial (KASHATUS *et al.*, 2015; SERASINGHE *et al.*, 2015). Embora existam evidências que apoiam a regulação da cofilina-1 sobre os processos de fissão mitocondrial dependentes de Drp1, essa relação em melanoma, especificamente, ainda é desconhecida. Além disso, a cofilina-1 foi relatada como reguladora da migração celular tardia e metástase em diferentes tipos de câncer (CASTRO *et al.*, 2010; HENSLEY *et al.*, 2016; IBAÑEZ *et al.*, 2019; POPOW-WOŹNIAK *et al.*, 2012). Em um trabalho de nosso grupo de pesquisa apresentamos um modelo celular de melanoma humano composto por sub-clones estáveis com características biológicas distintas, como produção de melanina e potencial metastático. Em um subclone metastático, encontramos maior expressão de cofilina-1, bem como elevada produção de ROS (BRACALENTE; SALGUERO; *et al.*, 2016). Curiosamente, níveis aumentados de ROS podem ser uma estratégia para sustentar a metástase por oxidação da proteína fosfatase *slingshot* 1 (SSH-1L) que se libera de sua proteína reguladora e ativa a cofilina-1 por desfosforilação (BRACALENTE; SALGUERO; *et al.*, 2016).

A cofilina-1 desempenha um papel fundamental em vários processos celulares, e sua concentração ou localização subcelular pode influenciar sua função. Li e colaboradores mostraram que a exposição de células cancerosas ao composto Erucin promove não apenas a desfosforilação da cofilina-1, mas também a translocação da cofilina-1 e de Drp1 para a mitocôndria, levando à fissão e apoptose (LI *et al.*, 2015). Outro estudo mostrou que a fissão mitocondrial em resposta ao tratamento com estaurosporina/etoposídeo/CCCP são dependentes de cofilina-1 (LI *et al.*, 2018). Este estudo propôs que Drp1 e G-actina translocam para a mitocôndria para formar o anel helicoidal em locais de constrição no início do processo de fissão mitocondrial. Posteriormente, a cofilina-1 se transloca para a mitocôndria para despolimerizar a F-actina. Como resultado, há uma dissipação do potencial de membrana mitocondrial (LI *et al.*, 2018). Além disso, a cofilina-1 também pode apresentar localização subcelular nuclear sob estímulos químicos ou físicos específicos, estando correlacionados com resistência em adenocarcinomas pulmonares (BECKER *et al.*, 2013). Recentemente, o mesmo fenômeno foi observado em uma coorte de pacientes de melanoma, na qual a agressividade da doença foi correlacionada com a localização subcelular nuclear desta proteína (BRACALENTE *et al.*, 2018). Portanto, não é importante apenas a expressão de cofilina-1 elevada, mas também sua localização, que pode ser usada como um marcador de prognóstico no melanoma e na progressão da lesão (BRACALENTE *et al.*, 2018; BRACALENTE; IBAÑEZ; *et al.*, 2016; BRACALENTE; SALGUERO; *et al.*, 2016; IBAÑEZ *et al.*, 2019).

Além da morfologia mitocondrial e de sua distribuição celular, algumas proteínas que compõem a estrutura de membrana dupla dessa organela são responsáveis pela sobrevivência celular. Enquanto proteínas integrais da membrana mitocondrial interna (MMI) coordena a OXPHOS, proteínas que interagem com a MME controlam a abertura do

poro de permeabilidade transitória e a apoptose. A apoptose é ativada quando a família de proteínas pró-apoptóticas Bcl-2 desencadeia a liberação de citocromo *c* para o citoplasma. As atividades das proteínas da família Bcl-2 são mediadas por meio de interações com o canal aniônico dependente de voltagem 1 (VDAC1), que controla a permeabilidade mitocondrial (SERASINGHE *et al.*, 2018). O inibidor de BRAF induz a acumulação mitocondrial de ATF2, que por sua vez induz a dissociação de BIM (proteína pró-apoptótica associada a Bcl-2) do complexo BIM/Mcl-1 (Regulador de apoptose MCL1) resultando na ativação dos processos apoptóticos dependentes da mitocôndria. Finalmente, o BIM interage com VDAC1 para liberar o citocromo *c*, promovendo a apoptose. É relevante destacar que a oligomerização de VDAC1 é necessária para que ocorram as alterações mitocondriais. No entanto, células que adquiriram resistência ao inibidor de BRAF apresentam inibição da oligomerização de VDAC1 (GAO *et al.*, 2015). Outra proteína Bcl-2 pró-apoptótica envolvida em células resistentes ao inibidor de BRAF é a BIK (matador de interação com BCL2). A subpopulação de células resistentes, caracterizado por uma parada no ciclo celular, apresenta baixos níveis de mRNA codificante de BIK. A expressão ectópica de BIK em células resistentes leva à sensibilidade à exposição subsequente ao tratamento com vemurafenibe/trametinibe (BORST *et al.*, 2017). Em concordância, tumores contendo células com maiores níveis de sinalização pró-apoptótica tornam-se mais sensíveis (o chamado "*priming* para morte"), apresentando uma melhor resposta clínica a diferentes agentes quimioterápicos (MONTERO *et al.*, 2015).

Em resumo, as evidências de pesquisa apresentadas destacam o papel fundamental da mitocôndria no melanoma não apenas como fonte de energia celular, mas também como coordenadora dos processos de invasão, influenciando o seu arranjo morfológico e o destino celular, determinando em última instância a progressão tumoral ou apoptose.

6 I CONCLUSÃO

Coletivamente, existem na literatura muitos indícios de que uma subpopulação de células tumorais que compartilha o mesmo perfil metabólico pode ser responsável pela manutenção, metástase e recidiva do melanoma após o tratamento. Mesmo apresentando ampla diversidade genética, o fenótipo resistente converge para um conjunto de características semelhantes, em que células apresentam ciclo celular lento, aumento nas taxas metabólicas mitocondriais e morfologia mitocondrial fusionada. A existência desta subpopulação levanta a possibilidade de um alvo clínico valioso para tratamentos combinados com quimioterápicos e para terapia alvo. Portanto, é necessário um esforço coordenado para melhorar nossa compreensão da dinâmica desse fenótipo agressivo e sua relação com o metabolismo tumoral. Assim, será possível, alcançar um tratamento majoritariamente eficiente e que tenha como alvo várias das vantagens metabólicas apresentadas por células tumorais responsáveis pela recidiva.

REFERÊNCIAS

ANDREUCCI, Elena *et al.* **SOX2 as a novel contributor of oxidative metabolism in melanoma cells.** *Cell Communication and Signaling*, v. 16, n. 1, p. 87–100, 2018.

BECKER, Matheus *et al.* **High cofilin-1 levels correlate with cisplatin resistance in lung adenocarcinomas.** *TUMOR BIOLOGY*, v. 35, n. 2, p. 1233–8, 2013.

BORST, Andreas *et al.* **BIK is involved in BRAF/MEK inhibitor induced apoptosis in melanoma cell lines.** *Cancer Letters*, v. 404, p. 70–78, 2017.

BRACALENTE, Candelaria *et al.* **Cofilin-1 levels and intracellular localization are associated with melanoma prognosis in a cohort of patients.** *Oncotarget*, v. 9, n. 35, p. 24097–24108, 2018.

BRACALENTE, Candelaria; SALGUERO, Noelia; *et al.* **Reprogramming human A375 amelanotic melanoma cells by catalase overexpression : Reversion or promotion of malignancy by inducing melanogenesis or metastasis.** *Oncotarget*, v. 7, n. 27, p. 41142–41153, 2016.

BRACALENTE, Candelaria; IBAÑEZ, Irene L; *et al.* **Reprogramming human A375 amelanotic melanoma cells by catalase overexpression : Upregulation of antioxidant genes correlates with regression of melanoma malignancy and with malignant progression when downregulated.** *Oncotarget*, v. 7, n. 27, p. 41154–41171, 2016.

CANTOR, Jason R; SABATINI, David M. **Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces.** *Cancer discovery*, v. 2, n. 10, p. 881–98, out. 2012.

CASTRO, Mauro Antonio Alves *et al.* **CFL1 expression levels as a prognostic and drug resistance marker in nonsmall cell lung cancer.** *Cancer*, v. 116, n. 15, p. 3645–3655, 2010.

CHAKRABARTI, Rajarshi *et al.* **INF2-mediated actin polymerization at the ER stimulates mitochondrial calcium uptake, inner membrane constriction, and division.** *Journal of Cell Biology*, v. 217, n. 1, p. 251–268, 2018.

CIERLITZA, Monika *et al.* **Mitochondrial oxidative stress as a novel therapeutic target to overcome intrinsic drug resistance in melanoma cell subpopulations.** *Experimental Dermatology*, v. 24, n. 2, p. 155–157, 2015.

CORAZAO-ROZAS, Paola *et al.* **Mitochondrial oxidative phosphorylation controls cancer cell's life and death decisions upon exposure to MAPK inhibitors.** *Oncotarget*, v. 7, n. 26, p. 39473–39485, 2016.

CORAZAO-ROZAS, Paola *et al.* **Mitochondrial oxidative stress is the achille's heel of melanoma cells resistant to Braf-mutant inhibitor.** *Oncotarget*, v. 4, n. 11, p. 1986–1998, 2013.

DELGADO-GOÑI, Teresa *et al.* **Increased in fl ammatory lipid metabolism and anaplerotic mitochondrial activation follow acquired resistance to vemurafenib in BRAF -mutant melanoma cells.** *British Journal of Cancer*, v. 122, p. 72–81, 2019.

DÍAZ-MARTÍNEZ, Marta *et al.* **miR-204-5p and miR-211-5p contribute to BRAF inhibitor resistance in melanoma.** *Cancer Research*, v. 78, n. 4, p. 1017–1030, 2018.

FRIEDMAN, Jonathan R.; NUNNARI, Jodi. **Mitochondrial form and function.** *Nature*, v. 505, n. 7483, p. 335–343, 2014.

GAO, Zongwei *et al.* **Mitochondrial ATF2 translocation contributes to apoptosis induction and BRAF inhibitor resistance in melanoma through the interaction of Bim with VDAC1.** *Oncotarget*, v. 6, n. 34, p. 36338–36353, 2015.

GIRNUN, Geoffrey D. **The diverse role of the PPARγ coactivator 1 family of transcriptional coactivators in cancer Geoffrey.** *Semin Cell Dev Biol.*, v. 23, n. 14, p. 381– 388., 2012.

GRAY-SCHOPFER, Vanessa; WELLBROCK, Claudia; MARAIS, Richard. **Melanoma biology and new targeted therapy**. *Nature*, v. 445, n. 7130, p. 851–857, 2007.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert a. **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646–74, 4 mar. 2011.

HAQ, Rizwan *et al.* **Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1α and MITF.** *Cancer Cell*, v. 23, n. 3, p. 302–315, 2013.

HENSLEY, Patrick J. *et al.* **Association of epithelial-mesenchymal transition and nuclear cofilin with advanced urothelial cancer.** *Human Pathology*, v. 57, p. 68–77, 2016.

IBAÑEZ, Irene L. *et al.* **Potential predictive value of cofilin-1 for metastasis occurrence in a small cohort of Argentinian patients with mid-low Breslow thickness melanoma.** *Pathology - Research and Practice*, n. August, p. 152582, 2019.

KANG, Hee Bum *et al.* **Metabolic Rewiring by Oncogenic BRAF V600E Links Ketogenesis Pathway to BRAF-MEK1 Signaling.** *Molecular Cell*, v. 59, n. 3, p. 345–358, 2015.

KASHATUS, Jennifer A. *et al.* **Erk2 phosphorylation of Drp1 promotes mitochondrial fission and MAPK-driven tumor growth.** *Molecular Cell*, v. 57, n. 3, p. 537–551, 2015.

KHAMARI, Raeeka *et al.* **Glucose metabolism and NRF2 coordinate the antioxidant response in melanoma resistant to MAPK inhibitors.** *Cell Death and Disease*, v. 9, n. 3, p. 325–339, 2018.

KIM, Eun Sung *et al.* **Mitochondrial dynamics regulate melanogenesis through proteasomal degradation of MITF via ROS-ERK activation.** *Pigment Cell and Melanoma Research*, v. 27, n. 6, p. 1051–1062, 2014.

LEBLEU, Valerie S. *et al.* **PGC-1α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis.** *Nature Cell Biology*, v. 16, n. 10, p. 992–1003, 2014.

LEONARDI, Giulia C. *et al.* **Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review).** *International Journal of Oncology*, v. 52, n. 4, p. 1071–1080, 2018.

LI, Guobing *et al.* **Mitochondrial translocation and interaction of cofilin and Drp1 are required for erucin-induced mitochondrial fission and apoptosis.** *Oncogene,* v. 6, n. 3, p. 1834-49.

LI, Guobing *et al.* **Mitochondrial fission and mitophagy depend on cofilin-mediated actin depolymerization activity at the mitochondrial fission site.** *Oncogene*, v. 37, n. 11, p. 1485–1502, 2018.

LIU, W. *et al.* **Reprogramming of proline and glutamine metabolism contributes to the proliferative and metabolic responses regulated by oncogenic transcription factor c-MYC.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, n. 23, p. 8983–8988, 2012.

MARCHETTI, Philippe *et al.* **Melanoma metabolism contributes to the cellular responses to MAPK/ERK pathway inhibitors.** *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, v. 1862, n. 4, p. 999–1005, 2018.

MARTIN, Shaun *et al.* **An autophagy-driven pathway of ATP secretion supports the aggressive phenotype of BRAFV600E inhibitor-resistant metastatic melanoma cells.** *Autophagy*, v. 13, n. 9, p. 1512–1527, 2017.

MAZAR, Joseph *et al.* **MicroRNA 211 Functions as a Metabolic Switch in Human Melanoma Cells.** *Molecular and Cellular Biology*, v. 36, n. 7, p. 1090–1108, 2016.

MONTERO, Joan *et al.* **Drug-Induced death signaling strategy rapidly predicts cancer response to chemotherapy.** *Cell*, v. 160, n. 5, p. 977–989, 2015.

NAKAGAWA, Hiroshi *et al.* **JARID1B Enables Transit between Distinct States of the Stem-like Cell Population in Oral Cancers.** *Cancer Research*, v. 76, n. 18, p. 5538–5549, 2016.

NOGUCHI, Fumihito *et al.* **Calcium-Dependent Enhancement by Extracellular Acidity of the Cytotoxicity of Mitochondrial Inhibitors against Melanoma.** *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 16, n. 5, p. 936–947, 2017.

OZTURK, Deniz Gulfem *et al.* **MITF-MIR211 axis is a novel autophagy amplifier system during cellular stress.** *Autophagy*, v. 15, n. 3, p. 375–390, 2019.

POPOW-WOŹNIAK, Agnieszka *et al.* **Cofilin overexpression affects actin cytoskeleton organization and migration of human colon adenocarcinoma cells.** *Histochemistry and Cell Biology*, v. 138, n. 5, p. 725–736, 2012.

RATNIKOV, B. I. *et al.* **Metabolic rewiring in melanoma.** *Oncogene*, v. 36, n. 2, p. 147–157, 2017.

RATNIKOV, Boris *et al.* **Glutamate and asparagine cataplerosis underlie glutamine addiction in melanoma.** *Oncotarget*, v. 6, n. 10, p. 14–18, 2015.

REHKLAU, Katharina *et al.* **Cofilin1-dependent actin dynamics control DRP1-mediated mitochondrial fission.** *Cell death & disease*, v. 8, n. 10, p. e3063, 2017.

ROESCH, Alexander *et al.* **Overcoming Intrinsic Multidrug Resistance in Melanoma by Blocking the Mitochondrial Respiratory Chain of Slow-Cycling JARID1Bhigh Cells.** *Cancer Cell*, v. 23, n. 6, p. 811–825, 2013.

SAHOO, Anupama *et al.* **MicroRNA-211 Loss Promotes Metabolic Vulnerability and BRAF Inhibitor Sensitivity in Melanoma.** *Journal of Investigative Dermatology*, v. 139, n. 1, p. 167–176, 2019.

SCHMITT, Ronald J *et al.* **Correlation between early FDG PET/CT response to BRAF and MEK inhibition and survival in patients with BRAF-mutant metastatic melanoma.** *Pathology of Melanocytic Tumors*, v. 37, n. 2, p. 314–329, 2018.

SERASINGHE, Madhavika N. *et al.* **Dual suppression of inner and outer mitochondrial membrane functions augments apoptotic responses to oncogenic MAPK inhibition.** *Cell Death and Disease*, v. 9, n. 2, p. 29, 2018.

SERASINGHE, Madhavika N. *et al.* **Mitochondrial division is requisite to RAS-induced transformation and targeted by oncogenic MAPK pathway inhibitors.** *Molecular Cell*, v. 57, n. 3, p. 521–536, 2015.

SHAIN, A. Hunter; BASTIAN, Boris C. **From melanocytes to melanomas.** *Nature Reviews Cancer*, v. 16, n. 6, p. 345–358, 2016.

SULLIVAN, Ryan J.; FLAHERTY, Keith T. **Resistance to BRAF-targeted therapy in melanoma.** *European Journal of Cancer*, v. 49, n. 6, p. 1297–1304, 2013.

THEODOSAKIS, Nicholas *et al.* **BRAF Inhibition Decreases Cellular Glucose Uptake in Melanoma in Association with Reduction in Cell Volume.** *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 14, n. 7, p. 1680–1692, 2015.

VAZQUEZ, Francisca *et al.* **PGC1α Expression Defines a Subset of Human Melanoma Tumors with Increased Mitochondrial Capacity and Resistance to Oxidative Stress.** *Cancer Cell*, v. 23, n. 3, p. 287–301, mar. 2013.

VOGEL, Felix C.E. *et al.* **Targeting the H3K4 demethylase KDM5B reprograms the metabolome and phenotype of melanoma cells.** *Journal of Investigative Dermatology*, 2019.

WIEDER, Shira Y. *et al.* **Activation of the Mitochondrial Fragmentation Protein DRP1 Correlates with BRAFV600E Melanoma.** *J Invest Dermatol*, v. 135, n. 10, p. 2544–2547, 2015.

YEUNG, S. J.; PAN, J.; LEE, M. H. **Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis - The seventh hallmark of cancer.** *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 65, n. 24, p. 3981–3999, 2008.

ZHANG, Gao *et al.* **Targeting mitochondrial biogenesis to overcome drug resistance to MAPK inhibitors.** *Journal of Clinical Investigation*, v. 126, n. 5, p. 1834–1856, 2016.

ZHENG, Bin *et al.* **Oncogenic B-RAF Negatively Regulates the Tumor Suppressor LKB1 to Promote Melanoma Cell Proliferation.** *Molecular Cell*, v. 33, n. 2, p. 237–247, 2009.

CAPÍTULO 18

RECURSOS AROMÁTICOS DA AMAZÔNIA: OBTENÇÃO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E APLICAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Data de aceite: 26/05/2021
Data de submissão: 12/04/2021

Edilene Carvalho Gomes Ribeiro
Universidade Federal do Maranhão
São Luís – MA
http://lattes.cnpq.br/1086142866463760
https://orcid.org/0000-0002-4994-9765

Denise Fernandes Coutinho
Universidade Federal do Maranhão
São Luís – MA
http://lattes.cnpq.br/7346399893912346
https://orcid.org/0000-0002-5665-9280

RESUMO: Os recursos aromáticos da Amazônia são considerados não apenas matéria-prima ou ponto de partida para a descoberta de novas moléculas, mas também como um recurso natural potencialmente ativo. Cada vez mais, estudos com plantas aromáticas dependem da inter-relação entre os diversos profissionais e disciplinas que compõem o estudo para que mais resultados promissores sejam alcançados, além de contribuir para o melhor uso e disponibilidade destes recursos naturais. As plantas aromáticas da Amazônia são consideradas fonte renovável apropriada para obtenção de óleos essenciais, aos quais são atribuídas muitas atividades biológicas que decorrem da grande diversidade de suas composições químicas. Diante da diversidade de substâncias bioativas presentes em óleos essenciais, este capítulo de livro faz uma abordagem sobre a importância das plantas aromáticas da Amazônia, destacando as principais famílias vegetais produtoras de óleos essenciais bem como os principais métodos de extração, composição química e aplicação diversa dos óleos essenciais.

PALAVRAS-CHAVE: Plantas aromáticas. Óleo essencial. Metabólitos secundários.

AROMATIC RESOURCES OF THE AMAZON: OBTAINING, CHEMICAL COMPOSITION AND APPLICATION OF ESSENTIAL OILS

ABSTRACT: Amazon aromatic resources are considered not only raw material or starting point for the discovery of new molecules, but also as a potentially active natural resource. Increasingly, studies with aromatic plants depend on the interrelationship between the various professionals and disciplines that make up the study so that more promising results are achieved, in addition to contributing to the best use and availability of these natural resources. Amazon aromatic plants are considered appropriate renewable source for obtaining essential oils, to which many biological activities are assigned from the great diversity of their chemical compositions. Faced with the diversity of bioactive substances present in essential oils, this book chapter makes an approach on the importance of the Amazon aromatic plants, highlighting the main vegetable families producing essential oils as well as the main extraction method, chemical composition and diverse application of essencial oils.

KEYWORDS: Aromatic plants. Essential oil. Secondary metabolites.

1 I INTRODUÇÃO

O Brasil é o país que apresenta maior diversidade vegetal do mundo, atingindo uma extraordinária biodiversidade na Amazônia e, consequentemente, abriga uma diversificada fonte de produtos naturais (FIORAVANTI, 2016). Mesmo o Brasil abrigando o maior banco natural de angiospermas do mundo e apresentando potencial de uso variado das plantas aromáticas, ainda tem muito que investir no conhecimento da diversidade e valor dessas plantas. A exuberância da flora da Amazônia abriga 50% da biodiversidade mundial e 22% de todas as plantas superiores, contudo diversos recursos naturais se perdem a cada quilômetro quadrado de floresta destruída (ZAPPI et al., 2015).

Acredita-se que estudos sobre os efeitos de plantas aromáticas na saúde humana, controle de vetores de doenças, ou como matérias-primas para as indústrias químicas, alimentícias e de cosméticos possam contribuir para sua conservação e utilização racional (RIBEIRO, 2016).

O uso de plantas e seus produtos derivados constitui um mercado altamente promissor, uma vez que a utilização de espécies vegetais, com fins terapêuticos, alimentícios, para a produção de cosméticos, perfumes ou outros produtos, vem se tornando crescente a cada dia em todo o mundo. Existem na região Amazônica grupos de pesquisas importantes que vem trabalhando para apresentarem potencial econômico de plantas aromáticas e inserir no mercado mais produtos com aplicação comercial. É importante que cada pesquisador considere o papel social que possui e o quanto, por meio de seus estudos e pesquisas, pode colaborar com o desenvolvimento do país, especialmente na criação de melhores condições para a população.

2 I PLANTAS AROMÁTICAS DA AMAZÔNIA

A Amazônia apresenta uma expressiva fração da diversidade mundial de plantas, animais e microrganismos. Estima-se a existência de quarenta mil espécies de plantas vasculares, das quais, trinta mil são endêmicas na região amazônica (FORZZA, 2010). Nesta região, há registros de duas mil espécies medicinais usadas pela população local como medicamentos, além de cerca de 1.250 espécies de plantas aromáticas (MAIA; ANDRADE, 2009).

Plantas aromáticas são espécies vegetais que possuem aroma capaz de sensibilizar o olfato, geralmente de forma agradável, cujos princípios ativos são constituídos, total ou majoritariamente, por essências (CORREA JÚNIOR et al., 2014). As plantas aromáticas são usadas desde tempos imemoriais pelos índios e fazem parte do cotidiano amazônico, independente do estrato social, religião ou grupo étnico. Foram apropriadas pelos brancos e seus descendentes caboclos e ribeirinhos, urbanos, classe média ou alta, que as utilizam na alimentação, na medicina, na cosmética natural, na perfumaria e nos rituais da aromaterapia amazônica (BARATA, 2012). Embora o conhecimento do poder de plantas

aromáticas seja milenar, somente nos últimos anos tem havido um interesse maior por parte de farmácias de manipulação, indústrias alimentícia e de medicamentos, e em vários ramos da biotecnologia, constituindo um mercado altamente promissor (SALES, 2015).

Os recursos naturais aromáticos da Amazônia são considerados uma fonte renovável apropriada para a produção de óleos essenciais e produtos derivados com interesse cormercial. As principais famílias de plantas aromáticas que predominam na região amazônica são (em ordem decrescente): Piperaceae, Asteraceae, Myrtaceae, Lamiaceae, Annonaceae, Lauraceae, Euphorbiaceae, Verbenaceae, Scrophulariaceae, Anacardiaceae (MAIA; ANDRADE, 2009). A Amazônia é rica em espécies aromáticas, contudo diversos recursos naturais se perdem a cada quilômetro quadrado de floresta destruída. Estima-se que o desmatamento tenha devastado até o ano de 2020 cerca de 438.006 km^2 de floresta e a principal consequência do desflorestamento na Amazônia é a perda de biodiversidade (INPE, 2021).

Essa floresta abrange quatro milhões de quilômetros quadrados (km^2) no território brasileiro e se estende a nove estados do país (Figura 1).

O Estado do Maranhão (oeste do meridiano 44º) foi incorporado à Amazônia brasileira pela Lei 1.806, de 06 de janeiro de 1953, e representa um dos estados que mais desmataram a floresta. Atualmente, a Amazônia Maranhense apresenta menos de 25% de sua vegetação original (INPE, 2021).

No Maranhão, a região amazônica propriamente dita é compreendida pelas regiões a oeste do paralelo 44 º e detém 26% do bioma amazônico (MARLÚCIA; OLIVEIRA, 2011). Aparece no cenário nacional como uma das áreas de maior diversidade vegetal, contudo quanto menor a quantidade de informações sobre os recursos existentes e possíveis formas de utilização sustentável, mais difícil é conscientizar a população da necessidade de sua conservação. Muito ainda tem que se investir no conhecimento da sua flora, pois poucas espécies têm sido descritas quanto às suas características morfológicas, composição química e atividades biológicas (MUNIZ, 2006; MARLÚCIA; OLIVEIRA, 2011).

Figura 1. Mapa da Amazônia Legal Brasileira

Fonte: Imazon (2015).

A família botânica Lamiaceae é uma das famílias de plantas aromáticas de grande relevância na região, sendo constituída por plantas herbáceas a arbustivas, caracterizadas por apresentar caule e ramos tetrangulares, flores zigomorfas, bilabiadas, e ovário com estilete ginobásico (BASÍLIO et al., 2006).

A família Lamiaceae compreende aproximadamente 258 gêneros e 7193 espécies, com ocorrência desde regiões tropicais até áreas de clima temperado (APG, 2017). No Brasil, existe cerca de 30 gêneros e 496 espécies nativas, sendo muitas destas endêmicas ao nordeste e região amazônica brasileira (HARLEY, 2012). Essa família apresenta grande variedade de classes de micromoléculas, existindo representantes da via do acetato, da via do ácido chiquímico e provenientes de biossíntese mista (FALCÃO; MENEZES, 2003). Importantes compostos biossintetizados pelo metabolismo secundário de suas espécies, como alcaloides, flavonoides, terpenos, cumarinas, lignóides e os óleos essenciais, tem despertado grande interesse pelo seu estudo por apresentarem atividades farmacológicas já descritas (LIMA; CARDOSO, 2013).

No Brasil, o gênero *Hyptis* abrange o maior número de representantes da família Lamiaceae, com 69,5% de espécies endêmicas, apresentando grande variabilidade de

metabólitos secundários, em especial os óleos essenciais, que conferem as principais características organolépticas do vegetal e têm grande valor junto a diversas comunidades devido as suas propriedades terapêuticas (HARLEY, 2012). Espécies desse gênero são tradicionalmente utilizadas no tratamento de infecções gastrointestinais, infecções da pele, câimbras e dores em geral (PINTO et al., 2010). Para esse gênero, já tem comprovada as atividades antibacteriana, fungicida, citotóxica, anti-inflamatória, anti-HIV e inseticida (COCK et al., 2019; FALCÃO; MENEZES, 2003; SARTORATTO et al., 2004).

Dentre as espécies pertencentes ao gênero *Hyptis*, destaca-se a espécie *Hyptis pectinata* (L.). É uma planta nativa, não endêmica e encontra-se distribuída predominantemente no norte do Brasil com destaque a região amazônica (HARLEY, 2012). É um arbusto aromático popularmente conhecido como “canudinho”, possui folhas aromáticas com linhas cruzadas, flores pequenas em inflorescências, hermafroditas, pentâmeras, zigomorfas e bilabiadas (Figura 2) (BISPO et al., 2001; FALCÃO et al., 2016).

Figura 2. *Hyptis pectinata* (L.) Poit

Fonte: Tropicos.org. Missouri Botanical Garden.

Esta espécie é amplamente utilizada na medicina tradicional para tratamento de distúrbios gastrointestinais, rinofaringite, congestão nasal, infecções cutâneas, febre, cólicas, inflamação e infecções causadas por bactérias e fungos (BISPO et al., 2001; FALCÃO; MENEZES, 2003; RAYMUNDO et al., 2011), também tem sido utilizada em enxaguatórios bucais previnindo doenças da cavidade oral, como a cárie dentária e dor orofacial (NASCIMENTO et al., 2008; PAIXÃO et al., 2013). Estudos farmacológicos com *H. pectinata* comprovaram ainda atividades hemostáticas, anti-edematogênico e regeneração

hepática em ratos (BASÍLIO et al., 2006).

A composição do óleo essencial de *H. pectinata* é bastante variável com predominância de sesquiterpenos. Os principais compostos já identificados no óleo essencial desta espécie são calamusenone, β-cariofileno, óxido de cariofileno, D-germacreno e timol (SANTOS et al, 2008; TCHOUMBOUGNANG et al., 2005). O óleo essencial de *H. pectinata,* já demostrou potencial antibacteriano considerável contra bactérias Gram-positivas de elevada patogenicidade e potencial antifúngico em linhagens de *Candida albicans* (NASCIMENTO et al. 2008; SANTOS et al., 2008). Outras atividades comprovadas para este óleo essencial foram o efeito antinoceptivo e anti-inflamatório (RAYMUNDO et al., 2011).

3 I ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais (OEs) são produtos abundantes em plantas aromáticas, às quais conferem odor e sabor característicos. A designação de "óleo" é devido a algumas características físico-químicas como, por exemplo, a de serem geralmente líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente, no entanto, é importante ressaltar que os OEs não possuem ácidos graxos sendo quimicamente diferentes da composição glicerídica dos óleos fixos. Sua principal característica é a volatilidade, que os diferenciam dos óleos de composição graxa, cujos componentes presentes são fixos e apresentam pontos de ebulição elevados (FIGUEIREDO et al., 2017).

Os OEs estão presentes em um grande número de plantas, sendo compostos por substâncias do metabolismo secundário, que não estão diretamente relacionados com o processo de crescimento, desenvolvimento e reprodução dos vegetais (GARCÍA; CARRIL, 2011). Por tempo, foram considerados "desperdício fisiológico" ou produtos de desintoxicação, tal como se dizia dos produtos do metabolismo secundário. Entretanto, com os avanços científicos, são atribuídas aos OEs várias funções ecológicas necessárias à sobrevivência do vegetal em seu ecossistema, como, a inibição da germinação de sementes (alelopatia), proteção contra calor ou frio, predadores, atração de polinizadores ou para repelir insetos (MIRANDA et al., 2016).

Os óleos essenciais são produzidos e armazenados em estruturas secretoras especializadas, tais como tricomas glandulares, canais oleíferos, células ou bolsas secretoras, que podem estar em vários órgãos dos vegetais. Assim, dependendo da espécie vegetal, os OEs podem estar presentes nas folhas, flores, ramos/caules, frutos, sementes ou raízes de diversas espécies (BUSATO et al., 2014).

3.1 Obtenção de óleos essenciais

Os óleos essenciais podem ser extraídos por diversos métodos, que variam conforme sua localização na planta e com a proposta de utilização do mesmo. Independente do

método de extração utilizado, o rendimento de óleo essencial obtido geralmente é muito baixo, inferior a 1%. Raramente, obtêm-se rendimentos com dois dígitos como o que ocorre nos botões florais de cravo, com rendimentos de até 15% (SILVEIRA, 2012).

Para obtenção dos OEs, os métodos de extração mais comuns são:

1. Enfleurage ou enfloração: método utilizado por algumas indústrias de perfumes, empregado para extrair óleo essencial de pétalas das flores. As pétalas são depositadas, à temperatura ambiente, sobre uma camada de óleo fixo, durante certo período de tempo, funcionando como líquido extrator. Quando esgotadas, as pétalas são substituídas por novas até a saturação total, este processo se repete por várias semanas. Na sequência a gordura é tratada com álcool e para obter o óleo, o álcool é destilado à baixa temperatura. É um processo lento, complexo, caro, mas o produto obtido possui alto valor comercial (BIASI; DESCHAMPS, 2009).

2. Arraste por vapor d'água: método mais utilizado para a extração de OEs a nível mundial, onde é possível obter óleos de diversas partes do vegetal. Neste processo o vapor d' água atravessa os tecidos da biomassa, levando consigo o óleo contido no interior de suas glândulas. O óleo vaporiza-se com o choque térmico, sendo "arrastado pelo vapor" até atingir o condensador, onde a mistura formada de óleo e hidrolato, resfria-se e volta à fase líquida. A separação do óleo e hidrolato ocorre por diferenças de polaridade e densidade. Neste método, a planta é colocada sobre uma placa perfurada de modo a evitar o contato direto com o solvente em ebulição (VALENTIM; SOARES, 2018).

3. Hidrodestilação: método mais utilizado em escala laboratorial. O material vegetal a ser destilado fica em contato direto com a água, e quando esta entra em ebulição, o vapor força a abertura das paredes celulares e ocorre a evaporação do óleo que está entre as células da planta. O vapor, que consiste na mistura de óleo e água, passa por um condensador, e quando se resfria, forma uma mistura heterogênea de duas fases, que são separados devido à diferença de polaridade e densidade entre a água e o óleo. Nessa extração, é comum utilizar o aparelho tipo Clevenger (BUSATO et al., 2014).

4. Extração por solventes orgânicos: método em que os OEs são extraídos por meio de solventes apolares, como hexano, benzeno, tolueno, dentre outros que preservem melhor a integridade dos compostos presentes. A extração por solvente dá origem a dois produtos: o concreto, que é o produto da primeira fase, resultante da extração com os solventes apolares; e o absoluto, obtido a partir do próprio concreto, após ser submetido a outro tipo de solvente, desta vez polar, como o etanol (SIMÕES, 2010).

5. Prensagem: método empregado exclusivamente para extrair óleo das cascas de frutos cítricos, que apresenta seus OEs em bolsas no pericarpo. O pericarpo é prensado por uma prensa hidráulica, e a camada que contém o óleo essencial é, então, coletada e, posteriormente, separa-se o óleo da emulsão formada com água através de decantação, centrifugação ou destilação fracionada (BUSATO et al., 2014).

6. Extração por CO_2 supercrítico: método que permite recuperar os aromas naturais

de vários tipos e não somente óleo essencial, de um modo bastante eficiente. É o método ideal para extração industrial de OEs. Nenhum traço de solvente permanece no produto obtido, tornando-o mais puro do que aqueles obtidos por outros métodos. Para tal extração, o CO_2 é primeiramente liquefeito através de compressão e, em seguida, aquecido a uma temperatura superior a 31 °C. Nessa temperatura, o CO_2 atinge um quarto estado, no qual sua viscosidade é análoga à de um gás, mas sua capacidade de dissolução é elevada como a de um líquido, extraindo o óleo com perfeição. Uma vez efetuada a extração, o CO_2 retorna ao estado gasoso, resultando na sua total eliminação (MSAADA et al., 2012)

7. Turbodestilação: método adequado para a extração de óleos onde o acesso às bolsas oleíferas é naturalmente mais difícil e de lenta obtenção, como é o caso de cascas, madeiras, raízes e sementes. Neste processo, as plantas são imersas na água, e o vapor circula em meio a esta mistura de planta e água. Através deste processo, a mesma água é continuamente reciclada e usada pelo sistema. Dessa forma, reduzem-se as dificuldades de acesso e o tempo da destilação (OLIVEIRA; JOSÉ, 2007).

3.2 Composição química e aplicação dos óleos essenciais

Do ponto de vista químico, OEs são misturas complexas, formadas por compostos orgânicos, que podem variar em número entre dezenas ou centenas de substâncias voláteis. Essas substâncias pertencem principalmente à classe dos terpenos que derivam da via do ácido mevalônico ou da rota da xilulose-5-P; e à classe dos fenilpropanoides, produtos obtidos pela via chiquimato (SIMÕES, 2010). A origem destes metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose formada através da fotossíntese (Figura 3).

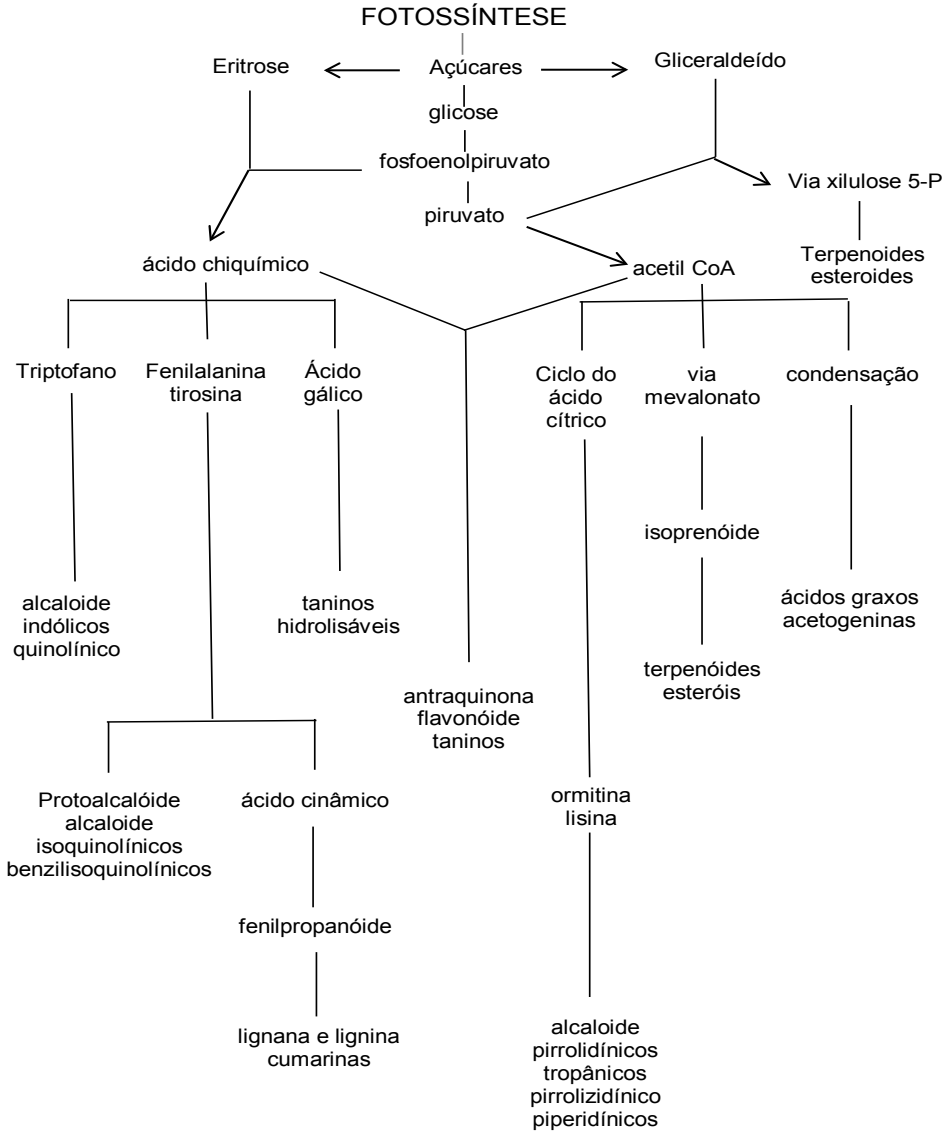


Figura 3. Esquema das rotas biossintéticas dos metabólitos secundários

Fonte: adaptado de Lupe et al. (2007).

Os terpenos são, geralmente, os constituintes mais importantes dos OEs. Estes compostos são constituídos por unidades contendo cinco átomos de carbono, denominadas unidades isoprênicas (Figura 4). A “regra do isopreno” permite classificá-los de acordo com o número de unidades isoprênicas que os formam, sendo assim, os terpenos podem ser considerados usualmente como produtos resultantes da ligação de várias unidades de isopreno (FONTES; ALÇADA, 2008).

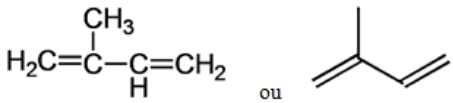


Figura 4. Representações da molécula de isopreno

Fonte: Fontes; Alçada (2008).

Os terpenos mais simples são os hemiterpenos, formados por apenas uma unidade de isopreno, sendo bastante instáveis e difíceis de serem isolados de produtos de plantas. Os monoterpenos são constituídos por duas unidades de isopreno (C10); os sesquiterpenos por três (C15); os diterpenos, por quatro unidades (C20); os triterpenos por seis (C30) e os tetraterpenos por oito (C40) unidades isoprênicas. Existem ainda os politerpenos formados por mais de oito unidades de isopreno (BUCHANAN et al., 2000).

Os terpenos podem apresentar diversas funções orgânicas, tais como álcoois, cetonas, aldeídos, ésteres, fenóis e hidrocarbonetos (SIMÕES, 2010). Dentre os compostos terpênicos, os mais freqüentes nos OEs são os monoterpenos e sesquiterpenos (SILVA et al., 2009).

É importante ressaltar que a composição química do óleo essencial pode variar consideravelmente de espécie para espécie. Os fatores responsáveis por essa variabilidade têm natureza diversa, classificados como intrínsecos, que dependem da genética e fisiologia da planta, ou extrínsecos, como as condições ambientais e de colheita (CUNHA, 2012; SIMÕES, 2010). Portanto, os OEs, assim como quaisquer metabólitos secundários, representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante (Figura 5), sendo assim, sua síntese e proporções no vegetal são frequentemente afetadas pelas condições ambientais (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Apesar dos compostos químicos presentes nos OEs apresentarem-se em diferentes concentrações, sempre há predominância de uma a três substâncias, designados de majoritários, que caracterizaram a essência da espécie vegetal (BAKKALI et al., 2008). Os constituintes dos OEs, geralmente são identificados por técnicas cromatográficas e espectrais (ADAMS, 2007). Essa identificação é importante para a compreensão e previsão dos respectivos efeitos biológicos do óleo essencial (COELHO, 2009).

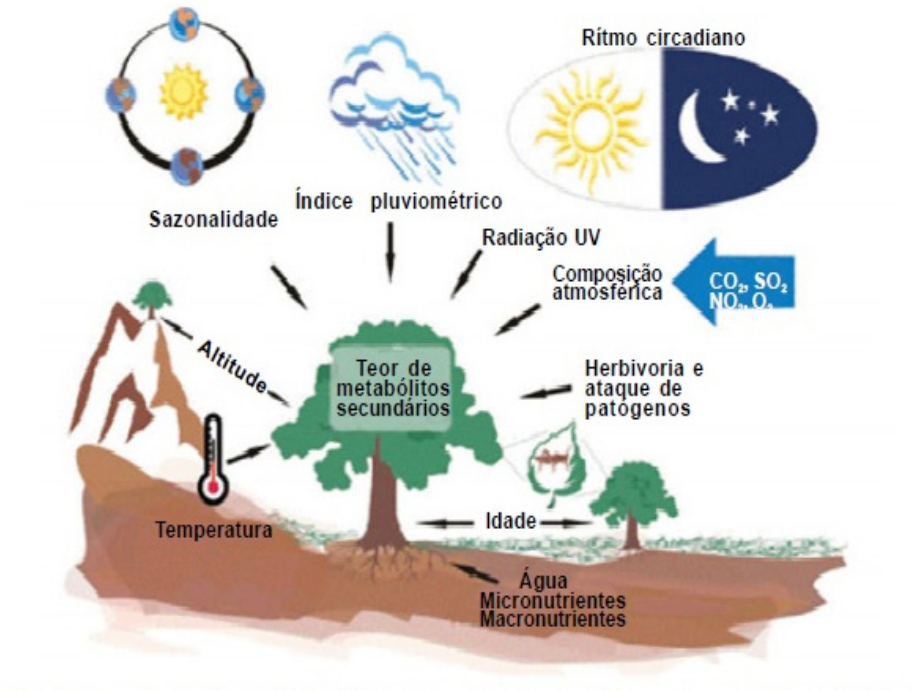


Figura 5. Fatores que influenciam quantitativamente e qualitativamente o acúmulo de metabólitos secundários na planta.

Fonte: Gobbo-Neto; Lopes (2007).

Os OEs são empregados como matérias-primas na indústria de química fina, para aplicação direta em produtos como perfumes, fragrâncias e cosméticos; nas indústrias de medicamentos (fitofármacos) solicitados pelos seus efeitos sobre o sistema digestivo e aparelho respiratório, pela atividade analgésica e anti-inflamatória ou por efeitos inespecíficos, particularmente sobre a pele e tecidos expostos; além de ser empregado na horticultura como inseticidas, fungicidas, bactericidas e larvicidas (BIZZO et al., 2009; COELHO, 2009; GNATTA et al., 2011).

As aplicações de OEs como ingredientes funcionais em formulações alimentícias, cosméticas ou ainda em sanitizantes, tem despertado grande interesse no setor industrial devido à grande aceitação dos consumidores por produtos naturais, bem como pelos danos à saúde propiciados pelos aditivos sintéticos (SCHERER et al., 2009).

A literatura apresenta ainda vários relatos sobre atividade biológica de OEs, decorrente da grande variedade e diversidade de suas composições químicas, a exemplo de atividade antioxidante (MIRANDA et al., 2016), antisséptico (CUNHA; ROQUE, 2013), larvicida (SANTANA et al., 2015), moluscicida (PEREIRA et al., 2020), antibacteriana (MILLEZI et al., 2014), anti-inflamatória (DE ARAÚJO et al., 2015), antifúngica, antiviral (MOHAMMADI et al., 2014) e ação anticarcinogênica (ZU et al., 2010), demostrando grande

potencial dos OEs para diversas atividades biológicas.

É importante ressaltar a toxicidade das plantas aromáticas, dos óleos essenciais delas isolados e dos componentes químicos presentes em óleos essenciais. Apesar das mais variadas ações dos óleos essenciais, a segurança na utilização desses óleos deve ser recomendada, uma vez que podem apresentar toxicidade elevada (SIMÕES, 2010).

Os efeitos tóxicos dos óleos voláteis incluem não somente aqueles decorrentes de uma intoxicação aguda (irritação cutânea, fototoxicidade, dermatite, alergia e reações no sistema nervoso central com efeitos convulsivantes e psicotrópicos), mas também pode ser decorrentes de intoxicação crônica, que apesar de ser pouco conhecida, é necessário avaliar suas eventuais propriedades mutagênicas, teratogênicas e/ou carcinogênicas (SIMÕES, 2010; WOLFFENBÜTTEL, 2011).

A toxicidade dos óleos essenciais é dose-dependente, entretanto, existem situações, nas quais mesmo o uso de baixas doses pode provocar reações severas, como nos casos de alergias de contato. Do ponto de vista químico, os óleos essenciais com alto teor de compostos insaturados são, geralmente, os mais tóxicos (CAVALINI et al., 2005). Tal fato reforça a necessidade do conhecimento da constituição química por parte dos profissionais que lidam com óleos essenciais.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**, Allured, Carol Stream, Ill,USA, 4th edition, 2007.

APG IV: **Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants**. The Catalogue of Life Partnership. Occurrence dataset, 2017. https://doi.org/10.15468/fzuaam accessed via GBIF.org.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology,** v. 46, p. 446–475, 2008. doi:10.1016/j.fct.2007.09.106

BARATA, L. E. S. A economia verde: Amazônia. **Ciência e Cultura,** v. 64, n. 3, p. 31-35, 2012. https://dx.doi.org/10.21800/S0009-67252012000300011

BASÍLIO, I. J. L. D. *et al*. Estudo farmacobotânico comparativo das folhas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. E *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 25, n. 4, p. 518-525, 2006.

BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C. **Plantas aromáticas: do cultivo à produção de óleo essencial.** Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora Ltda, 2009.

BISPO, M. D. *et al*. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. **Journal of ethnopharmacology**, v. 76, n. 1, p. 81-86, 2001.

BIZZO, H. R. HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588–594, 2009. doi:10.1590/s0100-40422009000300005

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants.** Rockville, Maryland: American Society Plant Physiologists, USA, p. 1251- 1268, 2000.

BUSATO, N. V. *et al*. Estratégias de modelagem da extração de óleos essenciais por hidrodestilação e destilação a vapor. **Ciência Rural**, v. 44, n. 9, p. 1574–1582, 2014. doi:10.1590/0103-8478cr20121330

CAVALINI, M. *et al*. SERVIÇO DE INFORMAÇÕES SOBRE PLANTAS MEDICINAIS E MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS. **Revista Eletrônica de Extensão**, v. 2, 2005.

COCK, I. E. *et al*. A review of the traditional use of southern African medicinal plants for the treatment of malaria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 245, 2019. doi:10.1016/j.jep.2019.112176

COELHO, M. G. Óleos essenciais para **aromaterapia**. 2009 123p. Dissertação, Escola de Ciências - Universidade do Minho, Braga, 2009.

CORREA JÚNIOR, C.; LIN, C. M.; SCHEFFER, M. C. **Cultivo de Plantas Medicinais, Condimentares e Aromáticas**. São Paulo: FUNEP, 1994.

CUNHA, A. P. **Plantas Aromáticas e Óleos Essenciais Composição e Aplicações.** Lisboa: Fundação Caloust Gulbenkian, 2012.

CUNHA, A. P.; ROQUE, O. R. **Aromaterapia - Fundamentos e Utilização**, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2013.

DE ARAÚJO, S. S. *et al*. Prospecção de patentes biotecnológicas com óleo essencial em microemulsão como agente anti-inflamatório. **Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 5, n. 2, p. 2058-2065, 2015.

FALCÃO, D. Q.; MENEZES, F. S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 84, n. 3, p. 69-74, 2003.

FALCÃO, R. E. A. *et al*. Evaluation of the orofacial antinociceptive profile of the ethyl acetate fraction and its major constituent, rosmarinic acid, from the leaves of *Hyptis pectinata* on rodents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 2, p. 203-208, 2016. https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.07.029

FIGUEIREDO, A. C.; LUIS, G. P.; BARROSO, J. G. Voláteis e Óleos Essenciais Parte I/II. **Ciência & Investigação**, n. 25, p. 14- 17, 2017.

FIORAVANTI, C. A maior diversidade de plantas do mundo. **Revista Pesquisa Fapesp**, v. 241, p. 42 – 47, 2016. Disponível em: https://revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2016/03/042-047_Botanica_241.pdf . Acesso em 06 jan. 2021

FONTES, R.; ALÇADA. N. **A bioquímica e a química orgânica**, 2008. Available from http://bioquimica.med.up.pt/ensino/fcnaup/quimicaorganica/1011/pdf/Bioquimica_e_Quimica_Organica.pdf

FORZZA, R. C. **Introdução: síntese da diversidade brasileira**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 1, n. 19-42, 2010.

GARCÍA, A. A.; CARRIL, E. P. Metabolismo secundario de plantas. **Reduca,** v. 2, n. 3, p. 119-145, 2011.

GNATTA, J. R. *et al*. O uso da aromaterapia na melhora da autoestima. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 45, n. 5, p. 1113-1120, 2011. https://doi.org/10.1590/S0080-62342011000500012

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007. doi:10.1590/s0100-40422007000200026

HARLEY, R. M. Checklist and key of genera and species of the Lamiaceae of the Brazilian Amazon. **Rodriguésia**, v. 63, n. 1, p. 129-144, 2012.

INPE (2021) Projeto PRODES - **Monitoramento do Desmatamento na Amazônia Legal por Satélite**. Disponível em: <http://terrabrasilis.dpi.inpe.br/app/dashboard/deforestation/biomes/legal_amazon/increments>. Acesso em: 10 jan.2021.

LIMA, R. K. CARDOSO, M. G. Família Lamiaceae: Importantes Óleos Essenciais com Ação Biológica e Antioxidante. **Revista Fitos Eletrônica,** v. 3, n. 3, p. 14-24, 2013. Disponível em: <http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/78/77>. Acesso em: 07 jan. 2021.

LISBOA, A. C. C. D. *et al*. Antinociceptive effect of *Hyptis pectinata* leaves extracts. **Fitoterapia**, v. 77, n.6, p. 439–442, 2006. doi:10.1016/j.fitote.2006.06.001

MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A. Database of the Amazon aromatic plants and their essential oils. **Química Nova**, n. 32, n.3, p. 595–622, 2009. doi:10.1590/s0100-40422009000300006

MARLÚCIA, B. M.; OLIVEIRA, T. G. **Amazônia Maranhense: Diversidade e Conservação**. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi. 328 p.: il, 2011. ISBN: 978-85-61377-52-6

MILLEZI, A. F. *et al*. Caracterização química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 1, p. 18–24, 2014. doi:10.1590/s1516-05722014000100003

MIRANDA, C. A. S. F. *et al*. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 213-220, 2016. https://doi.org/10.5935/1806-6690.20160025

MSAADA, K. et al. Comparison of Different Extraction Methods for the Determination of Essential oils and Related Compounds from Coriander (Coriandrum sativum L.). **Acta Chimica Slovenica**, v. 59, n. 4, 2012.

MUNIZ, F. H. **A vegetação da região de transição entre a Amazônia e o Nordeste: diversidade e estrutura**. In: Emanoel Gomes de Moura. (Org.). Agroambientes de transição entre o Trópico Úmido e o Semi-árido do Brasil: atributos, alterações e uso na produção familiar. 2 ed. v. 1, p. 53-69, 2006.

NASCIMENTO, P. *et al. Hyptis pectinata* essential oil: chemical composition and anti-*Streptococcus mutans* activity. **Oral Diseases**, v. 14, p. 485–489, 2008. doi:10.1111/j.1601-0825.2007.01405.x

OLIVEIRA, S. M.; JOSÉ, V. L. A. **Processo de extração de óleos essenciais**. Instituto de tecnologia do Paraná. Dossiê técnico, 2007.

PAIXÃO, M. S. *et al. Hyptis pectinata*: Redox Protection and Orofacial Antinociception. **Phytotherapy Research,** v. 27, n. 9, p. 1328–1333, 2013. doi:10.1002/ptr.4869

PEREIRA, L. P. L. A. *et al.* Essential oils as molluscicidal agents against schistosomiasis transmitting snails. **Acta Tropica***,* v. 209, 105489, 2020. doi 10.1016/j.actatropica.2020.105489

PINTO, J. E. B. P. et al. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marrubioides* Epl., Lamiaceae em função da sazonalidade. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.32, n.3, 2010. doi:10.4025/actasciagron.v32i3.3415

RAYMUNDO, L. J. R. P. *et al*. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis pectinata* (L.) Poit essential oil. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 134, 725–732, 2011. doi:10.1016/j.jep.2011.01.027

RIBEIRO, E. C. G. **Atividade moluscicida de óleos essenciais de plantas aromáticas da região Amazônica Maranhense**. 2016. 90p. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2016.

SALES, H. J. S. P. Lavandula L. - aplicação da cultura in vitro à produção de óleos essenciais e seu potencial económico em Portugal. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, n. 4, p. 992-999, 2015. https://doi.org/10.1590/1983-084X/14_101

SANTANA, H. *et al*. Essential oils of leaves of Piper species display larvicidal activity against the dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, 2015. doi:10.1590/1983-084x/13_052

SANTOS, P. O. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Hyptis pectinata (l.) Poit. **Química Nova**, v. 31, p. 1648–1652, 2008. doi:10.1590/s0100-40422008000700009

SARTORATTO, A. *et al.* Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275–280, 2004. doi:10.1590/s1517-83822004000300001

SCHERER, R. *et al*. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009. https://doi.org/10.1590/S1516-05722009000400013

SILVA, C. B. *et al*. Composição química e atividade alelopática do óleo volátil de *Hydrocotyle bonariensis* Lam (Araliaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 9, 2009. doi:10.1590/s0100-40422009000900026

SILVEIRA, J. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 15, p. 212, 2012.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6ª ed. UFSC: Florianópolis, pp. 1104, 2010.

TCHOUMBOUGNANG, F. *et al*. Aromatic plants of tropical Central Africa. XLVIII. Comparative study of the essential oils of four *Hyptis* species from Cameroon: *H. lanceolata* Poit., *H. pectinata* (L.) Poit., *H. spicigera* Lam. And *H. suaveolens* Poit. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, p. 340–343, 2005. doi:10.1002/ffj.1441

VALENTIM, J. A.; SOARES, E. C. Extração de Óleos Essenciais por Arraste a Vapor: Um Kit Experimental para o Ensino de Química. **Quím. Nova Esc**., v. 40, n. 4, p. 297-301, 2018. http://dx.doi.org/10.21577/0104-8899.20160131

WOLFFENBÜTTEL, A. N. **Base da química dos óleos essenciais e aromaterapia – abordagem técnica e científica**. São Paulo. Roca, 2011.

ZAPPI, D C. *et al*. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro , v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2175-78602015000401085&lng=en&nrm=iso>. access on 06 jan. 2021. http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860201566411.

ZU, Y. Activities of Ten Essential Oils towards Propionibacterium acnes and PC-3, A-549 and MCF-7 Cancer Cells. **Molecules**, v. 15, n. 5, p. 3200–3210, 2010. doi:10.3390/molecules15053200

CAPÍTULO 19

TECNOLOGIA DO DNA: CLONAGEM DE DNA EM CÉLULAS VIVAS E PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Data de aceite: 26/05/2021
Data de submissão: 12/03/2021

Claudio Fernando Graciano Martins
http://lattes.cnpq.br/8806964138384536

RESUMO: O advento da tecnologia do DNA possibilitou a obtenção, manipulação e amplificação de DNA de qualquer organismo, levando a grandes avanços da biologia celular e molecular na compreensão sobre o funcionamento das células e suas macromoléculas. As técnicas de clonagem de DNA em células vivas e pela reação em cadeia da polimerase (PCR), permitem isolar uma grande quantidade de um gene de interesse para a pesquisa biológica, incluindo várias aplicações no desenvolvimento de diagnóstico e tratamento para diversas doenças, medicina forense, produção de alimentos e proteínas recombinantes para benefícios da sociedade. O objetivo desta revisão bibliográfica é apresentar a importância do DNA e descrever as técnicas utilizadas para clonar e amplificar segmentos de DNA de interesse para a pesquisa básica e suas aplicações.
PALAVRAS-CHAVE: Clonagem de DNA. PCR. Tecnologia do DNA. DNA recombinante.

DNA TECHNOLOGY: DNA CLONING IN LIVING CELLS AND POLYMERASE CHAIN REACTION

ABSTRACT: The advent of DNA technology made it possible to obtain, manipulate and amplify the DNA of any organism, leading to great advances in cellular and molecular biology in understanding the functioning of cells and their macromolecules. The techniques of DNA cloning in living cells and by the polymerase chain reaction (PCR), allow the isolation of a large amount of a gene of interest for biological research, including several applications in the development of diagnosis and treatment for various diseases, forensic medicine, production of recombinant foods and proteins for the benefit of society. The objective of this bibliographic review is to present the importance of DNA and describe the techniques used to clone and amplify segments of DNA of interest for basic research and its applications.
KEYWORDS: DNA cloning. PCR. DNA technology. Recombinant DNA.

1 I INTRODUÇÃO

A descoberta da estrutura do DNA na década de 1950 e estudos posteriores, como o conhecimento sobre as atividades das endonucleases de restrição, DNA-ligases e DNA-polimerases levaram ao desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante (rDNA, de recombinant DNA), que consiste na obtenção, manipulação e amplificação de DNA. Essa amplificação, denominada clonagem de DNA, produz diversas cópias idênticas de um gene ou outro segmento de DNA e pode ser realizada em células hospedeiras vivas (*in vivo*) ou em tubo de ensaio (*in vitro*) pela reação em cadeia da

polimerase (PCR).

As técnicas de clonagem e amplificação de DNA são ferramentas essenciais para a pesquisa biológica quando o objetivo é o sequenciamento de DNA, expressão gênica, estudo de mutações (alterações no DNA) ou criação de vários tipos de alterações genéticas.

As técnicas envolvendo o DNA têm efeitos significativos na sociedade com diversas aplicações, incluindo o diagnóstico e tratamento de doenças, produção em larga escala de fármacos, como insulina para diabéticos, análises forenses para esclarecimento de crimes e teste de paternidade; e ainda, o desenvolvimento de animais e plantas transgênicos para melhorar a produção e qualidade dos alimentos.

O objetivo desta revisão bibliográfica é apresentar a importância do DNA e descrever os princípios básicos das técnicas de clonagem de DNA em células vivas e pela PCR e suas aplicações, contribuindo com a divulgação da ciência e estimulando o aprendizado cientifico.

2 | ÁCIDOS NUCLÉICOS: DNA E RNA

Os ácidos nucleicos, DNA (ácido desoxirribonucleico) e RNA (ácido ribonucleico), são polímeros (macromoléculas) formados pela união de monômeros chamados de nucleotídeos. Um nucleotídeo é formado por um açúcar de cinco carbonos (pentose), uma base nitrogenada e um grupo fosfato (REECE et al., 2015). No DNA o açúcar é uma desoxirribose e no RNA é uma ribose. Os nucleotídeos usados na síntese de DNA e RNA contêm cinco bases nitrogenadas diferentes classificadas em purinas (formadas por dois anéis, um anel de seis átomos ligado a outro anel de cinco átomos) e pirimidinas (formada por um anel de seis átomos). As bases purinas são Adenina (A) e Guanina (G), e as pirimidinas incluem Timina (T), Citosina (C) e Uracila (U). Além da diferença do açúcar que compõe o DNA e o RNA, também há diferença na base nitrogenada. Adenina, guanina e citosina são encontradas tanto no DNA quanto no RNA; a timina é observada apenas no DNA e a uracila apenas no RNA (LODISH et al., 2014). Os nucleotídeos são unidos uns aos outros por uma ligação chamada fosfodiéster (um grupo fosfato ligando dois açúcares de dois nucleotídeos) formando uma cadeia polinucleotídica (REECE et al., 2015). O DNA possui duas cadeias polinucleotídicas (fitas) antiparalelas entre si e o RNA apresenta normalmente uma fita única. Os nucleotídeos da dupla-hélice de DNA são unidos por ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas, ocorrendo o pareamento de adenina com timina e citosina com guanina. Esse pareamento das bases revela que uma sequência nucleotídica de uma fita de DNA é exatamente complementar a sequência de nucleotídeos da outra fita (ALBERTS et al., 2017).

A estrutura do DNA de dupla-hélice foi elucidada por James Watson e Francis Crick em 1953, com base nos dados de difração de raios X obtidos por Rosalind Franklin e Maurice Wilkins. A descoberta da estrutura do DNA é considerada por alguns a descoberta

biológica mais importante do século XX e concedeu a Watson, Crick e Wilkins, em 1962, o Prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina. Rosalind Franklin não foi agraciada com o Prêmio, pois faleceu de câncer em 1958, antes da premiação (GRIFFITHS et al., 2013).

Os dois tipos de ácidos nucleicos permitem que os organismos vivos reproduzam seus componentes complexos de uma geração para outra. O DNA é o material genético que possui a informação para sua própria replicação e também controla a síntese de RNA (transcrição) e, por meio do RNA, controla a síntese de proteínas (tradução). Esse fluxo direcional da informação é conhecido como dogma central da biologia molecular, proposto por Crick em 1956 (REECE et al., 2015). A descoberta da estrutura do DNA e a revelação do dogma central marcaram o início da biologia molecular (LODISH et al., 2014).

3 I TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE

O DNA, arquivo de informações da célula, é a principal fonte de compreensão sobre os processos biológicos moleculares celular. Um segmento do DNA com sequências de nucleotídeos que é capaz de produzir uma proteína ou molécula de RNA constitui o gene. O gene é a unidade da hereditariedade, e toda informação genética codificada no DNA de uma célula, representa o genoma de um organismo (COX et al., 2012). O gene é a base da maioria das técnicas da biologia molecular e, portanto, é desejável a capacidade de isolar um gene especifico ou alguma região do DNA genômico e amplificá-lo, de modo a obter material necessário para estudo. Isso só tornou possível, em meados da década de 1970, com o surgimento de técnicas que foram coletivamente chamadas de tecnologia do DNA recombinante (GRIFFITHS et al., 2013). Essa tecnologia permite a manipulação e amplificação de sequências de DNA de interesse produzindo um grande número de cópias idênticas. Essa amplificação é denominada clonagem de DNA e pode ser realizada por dois métodos distintos: *in vivo*, através de células hospedeiras vivas; ou *in vitro*, pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em tubo de ensaio. (SNUSTAD e SIMMONS, 2017).

Depois de ser clonado, em geral, o gene é sequenciado; isso significa, determinar a ordem da sequência de pares de bases. Se a função do gene for desconhecida, a sequência nucleotídica pode ser comparada a milhares de sequências gênicas armazenadas em bancos de genes digitais (GenBank, por exemplo), as vezes é possível deduzir a função do gene com base na semelhança com outros genes cujas funções são conhecidas. Os bancos de dados de sequências de ácidos nucleicos são recursos importantes tanto para a pesquisa biológica básica quanto para suas aplicações (SNUSTAD e SIMMONS, 2013).

As técnicas de clonagem e amplificação de DNA tornaram-se ferramentas essenciais quando se pesquisa a manutenção do genoma, o controle da expressão gênica e a função das proteínas (WATSON et al., 2015).

4 | CLONAGEM DE DNA EM VETORES PLASMIDIAIS DE *ESCHERICHIA COLI*

A clonagem de DNA *in vivo* envolve o corte do DNA de interesse e do vetor de clonagem com endonucleases de restrição, a união dos fragmentos com DNA-ligase formando moléculas de rDNA e a introdução dessas moléculas recombinantes na célula hospedeira para que ocorra a sua replicação (MADIGAN et al., 2016). Há vários tipos de vetores usados na clonagem de DNA, com maior frequência utiliza-se plasmídeos que replicam na bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*). A célula hospedeira de *E. coli* é amplamente utilizada para clonar DNA (LODISH et al., 2014).

4.1 Endonucleases de restrição

Endonucleases de restrição ou enzimas de restrição foram descobertas por pesquisadores que estudavam bactérias, e por suas contribuições, em 1978, Werner Arber, Dan Nathans e Hamilton Smith receberam o Prêmio Nobel de Fisiologia. A descoberta dessas enzimas deu origem a tecnologia do DNA, o que permitiu a produção de moléculas de rDNA (LOENEN et al., 2014).

As endonucleases de restrição são produzidas por bactérias, e sua função biológica é cortar ou digerir em sequências específicas, o DNA estranho de bacteriófagos (fagos) ou outros organismos (COX et al., 2012). Bactérias também produzem enzimas de modificação (metilação), que consiste em adicionar um grupo metil nas sequências específicas de reconhecimento das enzimas de restrição, impedindo a degradação do seu próprio DNA. Desse modo, o DNA bacteriano é protegido ao mesmo tempo em que destrói o DNA estranho (LODISH et al., 2014).

Geralmente, as endonucleases de restrição reconhecem sequências nucleotídicas (sítios de restrição) de 4 a 8 pb (pares de bases) de comprimento e são polindrômicas, isso quer dizer que a sequência de reconhecimento, lida na direção 5’ para 3’ é a mesma em ambas as direções do DNA (COX et al., 2012).

Diversas classes de endonucleases de restrição são conhecidas; porém, uma classe especial denominada enzimas de restrição tipo II, representa o maior grupo de enzimas caracterizadas e é frequentemente empregada para fragmentar o DNA. Esse tipo de enzima, geralmente faz cortes escalonados (coesivos) no DNA (LOENEN et al., 2014), gerando segmentos curtos de DNA de fita simples nas extremidades dos fragmentos. Se dois fragmentos de DNA de diferentes fontes forem produzidos pela ação da mesma enzima de restrição, ambos terão extremidades coesivas idênticas e poderão ser recombinados *in vitro*. A enzima DNA-ligase é usada para unir covalentemente diferentes fragmentos de DNA, produzindo moléculas de rDNA (TORTORA et al., 2017).

4.2 Plasmídeos como vetores de clonagem

A amplificação de uma sequência de DNA *in vivo* exige um vetor de clonagem, o

qual deve fornecer a informação necessária para a produção de numerosas cópias do DNA clonado na célula hospedeira em divisão. Os vetores mais comuns são os plasmídeos. Um plasmídeo é um DNA extracromossômico com replicação autônoma e é naturalmente encontrado em muitas bactérias e eucariotos unicelulares, como as leveduras. Em muitos casos, os plasmídeos contêm genes que conferem resistência a antibióticos para as bactérias (WATSON et al., 2015). Para sobreviverem na célula hospedeira, os plasmídeos incorporam algumas sequências especializadas fazendo uso dos recursos da célula para sua própria replicação e expressão gênica. As mesmas características que permitem os plasmídeos de sobreviverem em um hospedeiro bacteriano ou eucariótico são úteis para sua modificação genética, aperfeiçoando seu uso como vetores de clonagem (COX et al., 2012).

Os vetores utilizados para clonagem de DNA devem conter: uma origem de replicação independente do cromossomo do hospedeiro; um marcador de seleção, geralmente um gene que confere resistência a antibiótico à célula hospedeira, que permite identificar as células que possuem o vetor; um único sítio de clonagem para uma ou mais endonucleases de restrição, que corresponde a um local de clivagem encontrado só uma vez na molécula de DNA do vetor que não interfere nem na origem de replicação nem no gene marcador (SNUSTAD e SIMMONS, 2017).

Alguns vetores além de permitir o isolamento de uma sequência de DNA, também podem expressar proteínas heterólogas (recombinantes). Esses plasmídeos são conhecidos como vetores de expressão e possuem promotores de transcrição, derivados da célula hospedeira, imediatamente próximo ao sitio de clonagem. O promotor em um vetor de expressão pode ser escolhido de tal forma que a expressão do gene de interesse seja regulada pela adição de um composto simples ao meio de cultura, como por exemplo, um açúcar ou um aminoácido (WATSON et al., 2015).

Para clonar um fragmento de DNA em um vetor plasmidial, o DNA do plasmídeo é linearizado por uma endonuclease de restrição que o cliva em um único sítio, e o fragmento de DNA a ser clonado é então inserido nesse sítio utilizando DNA-ligase. Dessa forma, é formada a molécula de rDNA que está pronta para ser introduzida em uma célula hospedeira (ALBERTS et al., 2017).

4.3 *Escherichia coli* como célula hospedeira

E. coli, provavelmente, é o organismo mais conhecido da biologia e é uma ferramenta muito importante da pesquisa biológica, muitos pesquisadores a consideram quase que um animal de estimação de laboratório (TORTORA et al., 2017). Seu genoma é uma única molécula de DNA circular de fita dupla que contém 4,6 milhões de pares de bases e 4.300 genes (ALBERTS et al., 2017). Como a maioria das bactérias, *E. coli* se reproduz por divisão binária. Dessa forma, uma única célula se divide em duas células-filhas, originando uma população de clones, geneticamente idênticos. Esse processo exige cerca de apenas

20 minutos a 37ºC (COX et al., 2012).

A célula bacteriana de *E. coli* possui diversas vantagens como célula hospedeira na clonagem do DNA, entre elas, o crescimento rápido em um meio simples e barato contendo glicose e sais para suprir suas necessidades, seu metabolismo de DNA, assim como vários de seus processos bioquímicos é bem compreendido e seus plasmídeos bem caracterizados (COX et al., 2012; LODISH et al., 2014).

Para que ocorra a propagação do plasmídeo com o rDNA, o mesmo deve ser introduzido na célula de *E. coli* por um mecanismo chamado de transformação, processo pelo qual um organismo hospedeiro pode incorporar o DNA do ambiente. *E. coli* não é transformada naturalmente, porém pode tornar-se competente para receber o DNA do ambiente pela incubação em uma solução com íons de cálcio.

Apenas uma pequena porcentagem de células incubadas conseguirá captar o plasmídeo, portanto um antibiótico para o qual o plasmídeo confere resistência é incluído ao meio de cultivo, a fim de selecionar o crescimento das células que incorporaram o plasmídeo com o rDNA. As células que não captaram o plasmídeo não conseguiram sobreviver porque não possuem resistência ao antibiótico (WATSON et al., 20150. Ao se reproduzir, a célula bacteriana em divisão replica o plasmídeo recombinante e o transmite a seus descendentes. Desse modo, o rDNA com a sequência nucleotídica de interesse é amplificada centenas de vezes. Com o objetivo de verificar o produto plasmideal recombinante depois de ter sido copiado várias vezes na célula hospedeira, a bactéria pode ser lisada (rompida) e o DNA plasmideal purificado do restante do conteúdo celular. A sequência de interesse pode ser recuperada pela clivagem do DNA plasmideal com a mesma endonuclease de restrição que foi usada para inseri-la, e então separá-la do DNA plasmideal por eletroforese em gel - técnica que separa fragmentos de DNA de diferentes tamanhos (ALBERTS et al., 2017).

5 I CLONAGEM DE DNA PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Um método poderoso e versátil para amplificar DNA é a reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) que fornece uma abordagem mais rápida e direta para clonar DNA. Diferentemente da abordagem tradicional de clonagem usando vetores em células bacterianas, a PCR é realizada totalmente em tubo de ensaio (ALBERTS et al., 2017), e a sequência de DNA ou gene de interesse pode ser amplificado um milhão de vezes ou mais em apenas algumas horas. O uso desse procedimento requer apenas o conhecimento de sequências nucleotídicas curtas que flanqueiam a sequência de interesse. Os bancos de dados de sequências de ácidos nucleicos facilitam a amplificação pela PCR. A técnica da PCR foi desenvolvida por Kary Mullis e em razão da sua importância para a ciência, recebeu o Prêmio Nobel de Química em 1993 (SNUSTAD e SIMMONS, 2017).

5.1 Técnica da PCR

A PCR exige quatro componentes básicos para ser realizada. Esses componentes incluem o segmento de DNA a ser amplificado (DNA-alvo), um par de oligonucleotídeos (primers) iniciadores, quatro desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs) e DNA-polimerase (COX et al., 2012; GARIBYAN e AVASHIA, 2013). Os primers são fragmentos curtos de DNA com sequências complementares às extremidades do DNA-alvo e especificam a sequência exata a ser amplificada. A DNA-polimerase é a enzima responsável pela replicação do DNA a partir dos dNTPs. Os dNTPs atuam como blocos de construção usados pela DNA-polimerase para criar o produto de PCR (GARIBYAN e AVASHIA, 2013).

A técnica de PCR consiste em uma série de ciclos de três reações sucessivas envolvendo os quatro componentes mencionados acima. Inicialmente, o DNA-alvo é desnaturado pelo calor a uma temperatura aproximada de 95ºC. A alta temperatura é suficiente para quebrar as pontes de hidrogênio que ligam as duas fitas de DNA, dando origem ao DNA fita simples. Após o resfriamento, em torno de 50ºC a 65ºC, os dois primers podem se anelar (ligar) com suas sequências complementares nas moléculas de DNA fita simples. Em seguida a temperatura é elevada para 72ºC, neste momento a DNA-polimerase, na presença dos desoxirribonucleotídeos trifosfato, inicia a síntese de novas fitas de DNA adicionando nucleotídeos às fitas simples do segmento do DNA-alvo. A polimerização vai e volta entre os primers, formando DNA fita dupla. As três reações sucessivas de desnaturação, anelamento dos primers e síntese de DNA são repetidas várias vezes em poucas horas; portanto, o DNA-alvo é amplificado exponencialmente (GRIFFITHS et al., 2013).

Todos os reagentes; ou seja, os componentes necessários para a técnica da PCR, são adicionados em um tudo de ensaio, o qual é colocado em um aparelho chamado termociclador. O termociclador é automático e pode ser ajustado de acordo com a temperatura, tempo e número de ciclos desejados (TORTORA et al., 2017). A chave para a automatização da PCR foi a descoberta da enzima termoestável Taq-polimerase. Essa enzima é uma DNA-polimerase isolada da bactéria *Thermus aquaticus*. Essa bactéria vive em fontes termais e sua DNA-polimerase é estável a altas temperaturas, 95ºC. Isso significa que não há necessidade de acrescentar polimerase em cada ciclo da PCR, pois a Taq-polimerase é resistente ao calor e não é destruída durante a desnaturação do DNA (MADIGAN et al., 2016). Uma desvantagem da Taq-polimerase é a ausência da atividade de revisão, acarretando com maior frequência, erros de replicação. Quando há necessidade de alta fidelidade, a DNA-polimerase Pfu (de *Pyrococcus furiosus*) é empregada na PCR. A Pfu-polimerase tem atividade de revisão e é mais estável que Taq-polimerase (SNUSTAD e SIMMONS, 2017). Para suprir a demanda de DNA-polimerases termestáveis para os mercados de PCR, os genes dessas enzimas foram clonados em *E. coli* e produzidos comercialmente em larga escala (MADIGAN et al., 2016).

O DNA-alvo amplificado pela PCR pode ser utilizado para clonagem em *E. coli*. Para o processo de clonagem, antes da amplificação *in vitro*, pode ser incluído junto aos primers, sequências nucleotídicas que são reconhecidas por uma endonuclease de restrição específica que não possui um sítio de reconhecimento dentro do DNA-alvo. Após a amplificação, os segmentos-alvo são tratados com a endonuclease de restrição gerando fragmentos com extremidades coesivas facilitando a produção do rDNA (LODISH et al., 2014).

5.2 Transcriptase reversa seguida de PCR (RT-PCR)

Uma variação do método de PCR permite à amplificação de uma sequência de DNA complementar (cDNA). O cDNA é produzido a partir de uma molécula de mRNA (RNA mensageiro) pela enzima transcriptase reserva, isolada originalmente de retrovírus. Os retrovírus têm genomas de RNA que são copiados em DNA que se insere no cromossomo do hospedeiro. Desse modo, a enzima faz uma transcrição reversa sintetizando uma fita de cDNA utilizando como molde o mRNA (GRIFFITHS et al., 2013). O mRNA pode ser purificado a partir de células e a técnica da PCR com transcriptase reversa (RT-PCR) pode ser usada, por exemplo, para detectar sequências nucleotídicas codificadoras de proteínas; isso porque, genes de eucariotos possuem regiões não codificadoras denominadas íntrons (COX et al., 2012).

6 I APLICAÇÕES DA TECNOLOGIA DO DNA

A habilidade em manipular o DNA com precisão em um tubo de ensaio ou organismo (tecnologia do rDNA), teve um grande impacto em todos os aspectos da biologia celular e molecular, permitindo uma melhor compreensão sobre o funcionamento das células e suas macromoléculas (por exemplo, proteínas e ácidos nucleicos) (ALBERTS et al., 2017). Uma biblioteca de DNA pode ser construída a partir do genoma completo de qualquer organismo, sendo que todos os fragmentos gerados são clonados em um vetor, com a finalidade de sequenciar o genoma, descobrir genes ou determinar a função gênica (COX et al., 2012).

As técnicas envolvendo o DNA possibilitaram o surgimento de várias aplicações em diversas áreas, como na medicina, na agricultura e na ciência forense, beneficiando de forma ampla a vida humana (ALBERTS et al., 2017).

Uma das contribuições mais importantes da clonagem de DNA para a biologia celular e molecular é a capacidade de produzir qualquer proteína em quantidades quase ilimitadas, uma vez que se conhece o gene que codifica esta proteína (ALBERTS et al., 2017). Diversas proteínas recombinantes humanas são produzidas em larga escala para uso como fármacos; entre elas, insulina, hormônio do crescimento, interferon e fatores de coagulação do sangue (REECE et al., 2015), e ainda proteínas do envoltório viral para uso em vacinas, como exemplo, a vacina contra o vírus da hepatite B (ALBERTS et al., 2017).

A tecnologia do DNA possibilitou o desenvolvimento de plantas e animais transgênicos, isto é, seres vivos que possuem genes de outros organismos, e são conhecidos como organismos geneticamente modificados. Esses organismos têm como vantagens resistência a herbicidas, insetos e doenças microbianas, assim como produtos com melhor qualidade (MADIGAN et al., 2016).

As técnicas envolvendo o DNA permitem o diagnóstico de enfermidades. Pelo uso de PCR e primers específicos ao material genético do microrganismo alvo, é possível rastreá-lo em amostras biológicas para diagnóstico de doenças infecciosas. A PCR também é usada para diagnóstico de doenças genéticas com primers que têm como alvo os genes associados a essas doenças. Entre esses genes identificados em doenças humanas estão os genes da anemia falciforme, hemofilia, fibrose cística, entre outros. Esses genes e seus produtos são alvos potenciais para prevenção ou terapia (REECE et al., 2015). A terapia gênica para doenças hereditárias é o método mais promissor de tratamento eficaz. Esse tratamento consiste na introdução de uma cópia de gene saudável ao genoma de um indivíduo com gene defeituoso. Quando a terapia gênica é eficaz, o gene introduzido sintetiza o produto gênico ausente e restaura as características normais do indivíduo (SNUSTAD e SIMMONS, 2017).

Outra área envolvendo as técnicas de DNA é a medicina forense. A análise forense baseia-se na impressão digital de DNA (DNA fingerprint) pelo fato de que cada indivíduo, com a possível exceção de gêmeos idênticos, possui sequências nucleotídicas de DNA únicas. As análises forenses podem ser usadas para condenar indivíduos que cometeram crimes e ainda, absolver aqueles que foram condenados injustamente, através de amostras biológicas (sangue, sêmen, cabelo, unhas, etc.) coletadas na cena do crime (ALBERTS et al., 2017). A análise da impressão digital de DNA pode ser usada para testes de paternidade e na identificação de restos mortais (SNUSTAD e SIMMONS, 2017).

7 I CONCLUSÃO

A clonagem de DNA *in vivo* e *in vitro* tem como finalidade o isolamento, manipulação e amplificação de segmentos específicos de DNA. Essas técnicas de clonagem e amplificação contribuem para novas possibilidades de pesquisa, enriquecendo o conhecimento sobre a organização e funcionamento dos organismos. A tecnologia do DNA é cada vez mais presente no cotidiano das pessoas auxiliando no diagnóstico, tratamento e prevenção de diversas doenças, na produção de proteínas recombinantes, no aperfeiçoamento da produção e qualidade dos alimentos, entre outros.

É evidente que o conhecimento favorece o desenvolvimento tecnológico em diferentes áreas e isso tem efeitos significativos com grandes benefícios à sociedade.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

ALBERTS, B. et al. **Fundamentos da biologia celular**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

COX, M. M.; DOUDNA, J. A.; O'DONNELL, M. **Biologia molecular: princípios e técnicas**. Porto Alegre: Artmed, 2012.

GARIBYAN, L.; AVASHIA, N. **Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR).** Disponível em < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4102308/> Acesso em: 15/08/2020

GRIFFITHS, A. J. F. et al. **Introdução à genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

LODISH, H. et al. **Biologia celular e molecular**. 7.ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

LOENEN, W. N. et al**. Highlights of the DNA cutters: a short history of the restriction enzymes.** Disponível em < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3874209/> Acesso em: 15/08/2020

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14.ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

REECE, J. B. et al. **Biologia de Campbell**. 10.ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

SNUSTAD, P.; SIMMONS, M. J. **Fundamentos de genética**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

TORTOTA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

WATSON, J. D. et al. **Biologia molecular do gene**. 7.ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

CAPÍTULO 20

TESTES DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA ADAPTADOS PARA ÓLEOS ESSENCIAIS

Data de aceite: 26/05/2021
Data de submissão: 07/03/2021

Cristiane Mengue Feniman Moritz
Universidade Estadual de Maringá,
Departamento de Tecnologia
Campus de Umuarama - Paraná
http://lattes.cnpq.br/7906324507297720

Carolina Melchior Pereira
Universidade Estadual de Maringá,
Departamento de Tecnologia
Campus de Umuarama - Paraná
http://lattes.cnpq.br/9844378902447476

Nathália Righi Pessôa da Silva
Universidade Estadual de Maringá,
Departamento de Tecnologia
Campus de Umuarama - Paraná
http://lattes.cnpq.br/8067210990309163

Larissa Franciscatti Hoffmann
Universidade Estadual de Maringá,
Departamento de Tecnologia
Campus de Umuarama - Paraná
http://lattes.cnpq.br/2319887356290625

Adryelen Cassiano Martins
Universidade Estadual de Maringá,
Departamento de Tecnologia
Campus de Umuarama - Paraná
http://lattes.cnpq.br/5051872327705055

Giovanna Maísa Macanhan
Universidade Estadual de Maringá,
Departamento de Tecnologia
Campus de Umuarama - Paraná
http://lattes.cnpq.br/9347378720106366

Milene Ribeiro da Silva
Universidade Estadual de Maringá,
Departamento de Tecnologia
Campus de Umuarama - Paraná
http://lattes.cnpq.br/8409816220613721

Daniella Londero Silva Batisti
Universidade Estadual de Maringá,
Departamento de Tecnologia
Campus de Umuarama - Paraná
http://lattes.cnpq.br/6355093770594960

Lidaiane Mariáh Silva dos Santos Franciscato
Universidade Estadual de Maringá,
Departamento de Tecnologia
Campus de Umuarama - Paraná
http://lattes.cnpq.br/1328698701617650

RESUMO: Para a condução dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos naturais, principalmente óleos essências, os métodos oficiais são adaptados para evitar interferências das características físicas e químicas dos compostos testados. Este artigo teve o objetivo de relacionar os principais ajustes de protocolos de atividade antimicrobiana com produtos naturais empregados no Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Maringá – Campus Umuarama, com base nas pesquisas desenvolvidas, principalmente com óleos essenciais, entre os anos de 2010 a 2021. Foram descritos os ajustes para a solubilização dos óleos essenciais para o método da microdiluição em placas, para a leitura e interpretação dos resultados da Concentração Inibitória Mínima

(CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), além da possibilidade de se obter a informação do tempo necessário que um óleo essencial, em diferentes concentrações, requer para causar a morte bacteriana, como alternativa para o ensaio de cinética de morte microbiana. Em relação aos métodos de difusão em ágar foram abordadas as possíveis desvantagens da utilização dessas técnicas para a investigação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais.
PALAVRAS-CHAVE: Óleos essenciais, antimicrobianos naturais, testes de sensibilidade, microdiluição, difusão em ágar.

ANTIMICROBIAL SENSITIVITY TESTS ADAPTED TO ESSENTIAL OILS

ABSTRACT: For the conduct of sensitivity tests to natural antimicrobials, mainly essential oils, the official methods are adapted to avoid interferences of the physical and chemical characteristics of the tested compounds. This article aimed to relate the main adjustments of antimicrobial activity protocols with natural products used in the Microbiology Laboratory of the State University of Maringá - Campus Umuarama, based on the research developed, mainly with essential oils, between the years 2010 to 2021 Adjustments for the solubilization of essential oils for the microdilution plate method were described, for reading and interpreting the results of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC), and possibility of obtaining the information of the time required that an essential oil, in different concentrations, requires to cause bacterial death, as an alternative to the microbial death kinetics assay. Regarding the agar diffusion methods, the possible disadvantages of using these techniques to investigate the antimicrobial activity of essential oils were addressed.
KEYWORDS: Essential oils, natural antimicrobials, sensitivity tests, microdilution, agar diffusion.

1 I INTRODUÇÃO

Nos estudos sobre a atividade antimicrobiana de óleos essenciais ou outras substâncias antimicrobianas em estágio de desenvolvimento são empregados os Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA) tendo como base as normas dos documentos disponibilizados pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e pelo European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EuCAST).

No Brasil, em 14 de dezembro de 2018, o Ministério da Saúde publicou a Portaria nº 64 de 11/12/2018 que “Determina aos laboratórios de rede pública e rede privada, de todas as Unidades Federadas, a utilização das normas de interpretação para os testes de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA), tendo como base os documentos da versão brasileira do European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, o BrCAST”, com prazo de 12 meses para adequação dos laboratórios de microbiologia das redes pública e privada.

Os protocolos de TSA são referentes aos agentes antimicrobianos aprovados pelas agências regularizadoras internacionais, já correlacionados com as características físico-

químicas de cada antimicrobiano. No entanto, quando se trata de pesquisa científica para a prospecção de novos ativos antimicrobianos é relevante considerar as interferências das características físicas e químicas desse ativo nos TSA, como a solubilidade em meio aquoso ou o solvente mais apropriado, a coloração do ativo, as concentrações mínimas a serem testadas, o grau de dispersão em ágar e outros fatores a serem considerados, por influenciar a leitura dos resultados qualitativos ou quantitativos.

Portanto, os TSA aplicados para compostos naturais, como extratos e óleos essenciais, necessitam de adaptações dos métodos oficiais. Os ajustes de protocolos são muitas vezes baseados nas capacidades laboratoriais dos centros de pesquisa, com base nos estudos científicos já publicados. De certa forma, as diferentes condições de análise pode ser um fator interferente nas distorções de resultados encontrados em diferentes pesquisas com os mesmos extratos ou compostos. Além das variáveis associadas à composição química dos produtos naturais, como por exemplo os óleos essenciais, a comparação de pesquisas científicas com ativos naturais da mesma espécie também sofre a possível dispersão de resultados em função da falta de padronização dos TSA utilizados na prospecção e desenvolvimento de antimicrobianos naturais.

O objetivo deste capítulo foi relacionar os principais ajustes de protocolos de atividade antimicrobiana com produtos naturais empregados no Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Maringá – Campus Umuarama, com base nas pesquisas desenvolvidas, principalmente com óleos essenciais, entre os anos de 2010 a 2021.

2 | SOLUBILIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS PARA O MÉTODO DA MICRODILUIÇÃO EM PLACAS

O método de microdiluição em placas é o mais empregado dentro dos métodos de diluição para os TSA. A leitura dessa técnica permite determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), definida como a menor concentração capaz de inibir qualquer crescimento microbiano visível.

Nos ensaios com óleos essenciais é fundamental garantir a máxima homogeneização da maior concentração a ser testada. Na rotina do laboratório de Microbiologia, da UEM – Campus Umuarama, tem-se como premissa testar o óleo essencial em questão na maior concentração de 25,6 mg mL^{-1}, equivalente a 2,56%. No entanto, essa concentração é preparada dupla (51,2 mg mL^{-1}) em caldo Mueller Hinton adicionado de 0,5% de Tween 80 (polissorbato 80), para ser adicionada no volume de 50 μL no poço da microplaca, o qual receberá posteriormente 50 μL de inóculo preparado também em caldo Mueller Hinton, na concentração de aproximadamente 1,0 x 10^{-6} UFC mL^{-1}. Após a adição do inóculo, a concentração final do poço com a maior concentração a ser testada será a estabelecida de 25,6 mg mL^{-1} e a concentração do inóculo será de 0,5 x 10^{-6} UFC mL^{-1}.

A adição de Tween 80 no Caldo Mueller Hinton tem como objetivo emulsificar o óleo essencial, uma vez que o meio de cultura é preparado como uma solução aquosa

e o óleo essencial é imiscível em água. Para o preparo da concentração dupla de óleo essencial utiliza-se um tubo de ensaio, em que é adicionado o volume de óleo essencial correspondente ao peso necessário para a concentração que se deseja (considerando a densidade do óleo essencial) e segue a adição do mesmo volume de propilenoglicol, com a finalidade de aumentar a solubilização do óleo essencial. Após agitação em vórtex, adiciona-se o caldo Mueller Hinton no volume necessário para completar a solução.

Utilizando somente o Caldo Mueller Hinton com 0,5% de Tween 80 no preparo da maior concentração, percebeu-se que minutos após a agitação em vórtex o óleo essencial separava-se da solução, o que não garantia a adição homogênea nos poços da maior concentração a ser testada, com interferência direta nos demais poços da diluição sequencial.

A adoção da etapa de adição de propilenoglicol facilitou a solubilização do óleo essencial no Caldo Mueller Hinton, mas ainda não é possível obter uma solubilização completa dependendo do tipo de óleo essencial que está sendo testado.

Espécie vegetal	Óleo essencial				Nanoemulsão			
	ATCC 29213		ATCC 25922		ATCC 29213		ATCC 25922	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
Aroeira vermelha - sementes (*Schinus terebinthifolius*)	> 25.6	> 25.6	12.8	> 25.6	> 25.6	> 25.6	< 0.05	0.2
Canela - cascas (*Cinnamomum cassia*)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4	0.8	0.1	0.2
Tea tree - folhas (*Melaleuca alternifolia*)	> 25.6	> 25.6	6.4	> 25.6	< 0.05	< 0.05	1.6	1.6

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de óleos essenciais e suas respectivas nanoemulsões. Concentrações em mg mL^{-1}.

Em um experimento de rotina para comparar a atividade antibacteriana de três óleos essenciais e suas respectivas nanoemulsões, preparadas pelo método de baixa energia (rotação a 100 rpm) e mantendo o Tween 80 como emulsificante, obteve-se CIMs menores para as nanoemulsões em relação aos seus respectivos óleos essenciais, para os óleos essenciais de aroeira vermelha e tea tree (Tabela 1).

3 I LEITURA E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DA CIM

A leitura dos resultados do teste de microdiluição em placas pode ser por meio da turbidez (densidade óptica) ou utilizando indicadores colorimétricos.

Na leitura do teste de microdiluição em placas utilizando a turbidez, há a necessidade da disponibilidade de equipamento de leitura de absorbância para microplacas, denominado leitora de microplacas. O crescimento microbiano nos poços contendo o antimicrobiano deve

ser comparado com os poços contendo meio de cultura sem o antimicrobiano, utilizados como controles negativos. De acordo com a norma do CLSI, deve-se ler o ponto final na concentração em que haja uma redução de 80% ou mais do crescimento microbiano, quando comparado com o controle. Essa tolerância foi estabelecida em consequência de um ligeiro crescimento bacteriano quando são testados os antimicrobianos convencionais trimetoprim e as sulfonamidas.

No caso de teste de microdiluição com produtos naturais, a leitura da absorbância pode ter o inconveniente de interferência na turbidez quando se trata de óleos essenciais microencapsulados (causam a turvação do meio) e com extratos aquosos ou hidroalcoólicos (com coloração característica da planta).

Na Tabela 2 está um exemplo dos valores de leitura de absorbância de uma microplaca em que foi testado um óleo essencial microencapsulado com ciclodextrina. Observa-se no poço B da coluna 1 (controles negativos) um valor superior aos demais valores. Isso ocorreu pois foi estabelecido como protocolo do laboratório reservar um poço da coluna 1 para o controle negativo da maior concentração e outro poço para o controle negativo da menor concentração (poço C da coluna 1).

	Controle negativo	Controle positivo	C1: 25,6 mg mL^{-1}	C2: 12,8 mg mL^{-1}	C3: 6,4 mg mL^{-1}	C4: 3,2 mg mL^{-1}	C5: 1,6 mg mL^{-1}	C6: 0,8 mg mL^{-1}	C7: 0,4 mg mL^{-1}	C8: 0,2 mg mL^{-1}	C9: 0,1 mg mL^{-1}	C10: 0,05 mg mL^{-1}
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	0,047	0,652	2,689	2,196	1,911	1,937	1,869	1,459	1,007	0,637	0,648	0,68
B	2,311	0,507	2,782	1,907	1,879	1,831	1,551	0,857	0,564	0,614	0,674	0,657
C	0,059	0,634	2,683	2,171	2,089	1,966	1,832	1,357	0,792	0,47	0,579	0,605
D	0,058	0,59	2,645	2,098	1,725	1,946	1,838	1,726	1,142	0,601	0,64	0,716
E	0,057	1,421	2,551	2,042	1,962	1,855	1,688	1,51	1,312	1,161	1,262	1,309
F	0,059	1,185	2,604	2,341	1,682	1,628	1,303	1,171	1,274	1,302	1,184	1,236
G	0,067	1,481	2,578	2,086	2,022	1,906	1,764	1,562	1,231	1,327	1,238	1,289
H	0,06	1,381	2,611	2,14	1,991	1,959	1,872	1,645	1,46	1,255	1,177	1,256

Tabela 2 – Absorbância obtida na leitora de microplacas para o teste de sensibilidade antimicrobiana de óleo essencial microencapsulado com ciclodextrina.

Antes da implantação da leitura da absorbância para os testes de microdiluição em placas no Laboratório de Microbiologia da UEM – Campus Umuarama, era adotada apenas a leitura do teste com o indicador de óxido-redução resazurina, o qual adquire coloração rosa no caso de crescimento microbiano e permanece com coloração azul nos poços em que houve inibição microbiana. Os métodos colorimétricos para determinar a CIM são

considerados rápidos e de baixo custo, pois não necessitam de equipamento. No entanto, a mesma dificuldade de observação do resultado positivo ou negativo permanece quando se trata um extrato aquoso ou hidroalcoólico com coloração. Na Figura 1 observa-se essa interferência por conta da coloração do extrato aquoso testado, o que pode gerar um resultado falso-positivo. No poço B2 ocorreu uma coloração intensa do controle negativo, contendo a maior concentração testada. Para o analista, nesse caso ocorre a dúvida principalmente em relação às colunas 3 a 6, se a coloração é em função do crescimento microbiano ou do próprio extrato testado.

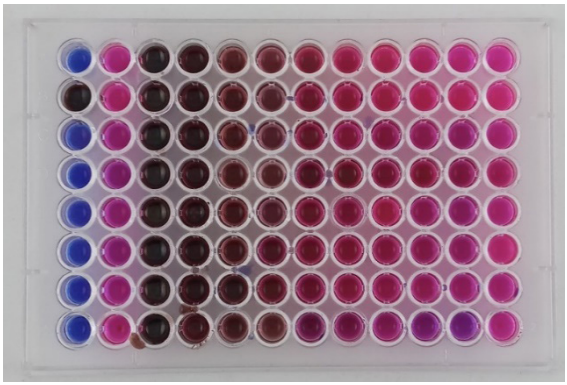


Figura 1 – Microplaca para leitura da Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizando o indicador resazurina.

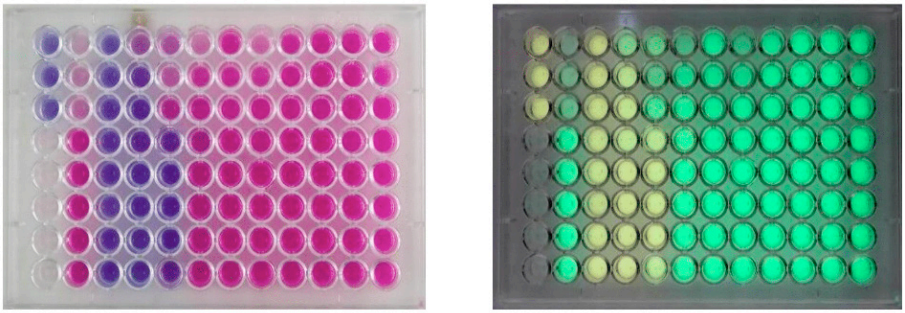
O método de microdiluição proposto por Mann e Markham (1998), para a determinação da CIM de óleos essenciais, baseou-se na comparação da leitura visual e fotométrica das microplacas e demonstrou que os resultados da microdiluição podem ser avaliados sem instrumentação.

A resazurina é um indicador de óxido-redução que foi extensivamente utilizada na investigação da qualidade do leite. Para a detecção de *Mycobacterium tuberculosis* o método em placa por microdiluição proposto por Palomino *et al*. (2002), utilizando a resazurina foi denominado como REMA (Resazurin Microtiter Assay).

No entanto, a leitura da microplaca com o indicador resazurina passa a ser subjetiva e dependente a percepção do analista. Em determinadas situações, conforme o óleo essencial que está sendo testado, a diferenciação de cor entre o azul e o rosa fica comprometida e causa incerteza na leitura de crescimento microbiano positivo ou negativo.

Visando a possibilidade da utilização de uma técnica mais precisa para a realização da leitura CIM de óleos essenciais pelo método do indicador resazurina, utilizou-se o software ImageJ (disponível em https://imagej.nih.gov/ij/) para obter a diferenciação dos poços positivos e negativos quanto ao crescimento microbiano. O princípio baseia-se na leitura colorimétrica por meio da inversão de cores, para fins de comparação da leitura

dos resultados pelas fotografias originais. Na Figura 2A observa-se a imagem de uma microplaca tratada pelo método indicador resazurina e na Figura 2B, a imagem analisada pelo software.



A B

Figura 2 – Microplaca do método de microdiluição para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de óleos essenciais. (A): imagem original da microplaca após a incubação com o indicador resazurina. (B): imagem tratada pelo Software ImageJ.

A primeira coluna de poços microplaca foi reservada como referência os poços de controle negativo, em que não foi adicionada a cultura microbiana. No poço A1 foi adicionado apenas o meio de cultura Caldo Mueller Hinton, no poço B1 foi adicionada o meio de cultura com a maior concentração de óleo essencial e no poço C1 continha o meio de cultura com a menor concentração de óleo essencial.

Os poços da segunda coluna da microplaca foram reservados para os controles positivos dos microrganismos em teste, constituindo-se apenas dos inóculos em meio de cultura (ausência de antimicrobiano).

Na leitura visual do resultado, nos poços de coloração rosa entendeu-se que houve redução do indicador, pela reação com o meio de cultura reduzido em função do metabolismo microbiano, ou seja, que não houve inibição da cultura (resultado positivo). Nos poços de coloração azul houve inibição microbiana (resultado negativo).

Nos poços da linha 1, colunas 4 e 5, observou-se que as cores apresentadas não foram semelhantes as cores tomadas como padrão positivo ou negativo, o que gerou dúvida e não se pode afirmar se houve ou não inibição do crescimento microbiano. Observando a Figura 2B, foi possível verificar com clareza o resultado dos poços citados anteriormente, sendo que para ambos os casos não houve inibição do crescimento microbiano (indicação da coloração verde). A inversão das cores disponível no software permitiu uma maior visibilidade dos resultados, uma vez que o comando inverte todas as cores e valores de brilho dos pixels da camada ativa da imagem, tornando áreas claras em áreas escuras. Os resultados da comparação foram expostos similarmente como mostra a Figura 3, na qual

os símbolos (+), (-) e (+/-) representam se houve crescimento microbiano, se não houve crescimento microbiano e incerteza do resultado, respectivamente.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	+	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+
B	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
C	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
D		+	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+
E		+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
F		+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
G		+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
H		+	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+

A

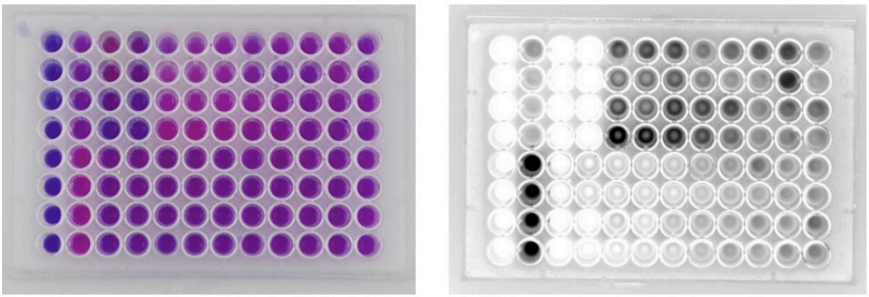
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
C	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
D		+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
E		+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
F		+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
G		+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
H		+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

B

Figura 3 – Representação da leitura dos resultados obtidos na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de óleos essenciais. (A): analisando imagem original da microplaca após a incubação com o indicador resazurina. (B): analisando a imagem tratada pelo Software ImageJ. (+): crescimento microbiano. (-) inibição microbiana. (+/-) incerteza do resultado.

A resazurina é um indicador químico, que durante a sua redução há alteração de cor. No leite e em solução aquosa, a resazurina é azul e se reduz para resorufina, de coloração rosa. A resorufina pode ser reduzida ainda à hidrorresorufina, um composto incolor. A reação para resorufina é irreversível, enquanto que a redução para hidrorresorufina é reversível (ERB; EHLERS, 1950). O que explica que alguns poços do controle positivo (segunda coluna da Figura 2A) tenham ficado incolores.

A resazurina, também referenciada como Alamar Blue, é azul e não fluorescente. Quando reduzida pela atividade celular, provavelmente pelo consumo de oxigênio no metabolismo microbiano, passa a ter coloração rosa fluorescente (O'BRIEN, 2000). Essa fluorescência pode ser fotografada em fotodocumentador para géis de eletroforese. Na Figura 4 estão as imagens da microplaca com o teste de microdiluição de um óleo essencial, fotografadas por câmera de celular (A) e por fotodocumentador (B).



A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	+	?	±	+	+	+	+	+	+	+	+
B	-	+	?	±	+	+	+	+	+	+	+	+
C	-	+	±	-	+	+	+	+	+	+	+	+
D	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
E	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

C

B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
B	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
C	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
D	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
E	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
H	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

D

Figura 4 – Microplaca do método de microdiluição para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de óleos essenciais. (A): imagem fotografada por câmera de celular. (B): imagem obtida em fotodocumentador. (C): representação da leitura dos resultados observando (A). (D): representação da leitura dos resultados observando (B). (+): crescimento microbiano. (-) inibição microbiana. (+/-) incerteza do resultado. (?): sem parâmetro.

Foi estabelecido como protocolo no teste de microdiluição em placas a utilização do indicador resazurina para a leitura do resultado da CIM, de forma que é adicionado o indicador após a incubação com o inóculo. A microplaca permanece overnight sob refrigeração, com a leitura do resultado no dia posterior. Esse tempo se faz necessário para que haja a completa redução do indicador nos poços em que ocorreu crescimento microbiano. No entanto, mesmo após esse tempo pode ocorrer dificuldades na leitura, como observado na Figura 4A. Desse modo, a imagem por fotodocumentador tornou-se fundamental para evitar as incertezas nos resultados e a dependência dos referenciais de cor de cada analista.

É nítida a diferença dos poços com crescimento microbiano dos poços em que ocorreu inibição (Figura 4B). Esse fato traz um conforto ao analista para expressar os resultados sem dúvidas e incertezas. No entanto, os registros das microplacas utilizados fotografias com câmeras convencionais continuam sendo realizados no laboratório.

4 | CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Realizando o repique de cada poço da microplaca após a incubação, utilizada no método de microdiluição para a determinação da CIM, em meio de cultura solidificado é possível determinar qual a concentração necessária do óleo essencial em estudo para promover a morte celular, ou seja, a Concentração Bactericida Mínima (CBM) para bactérias ou Concentração Fungicida Mínima (CFM) para leveduras e fungos filamentosos.

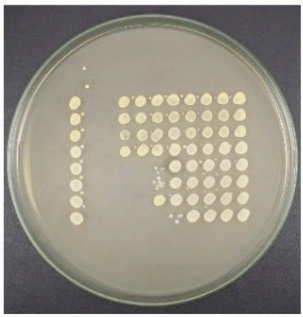
No entanto, o repique para a CBM utilizando o ponto final de incubação para a determinação de CIM não permite uma visão sobre o processo de morte que ocorre durante o período de incubação de 24 horas na presença do agente antimicrobiano. Além da CIM, informações confiáveis sobre a propriedade microbicida de um agente antimicrobiano é essencial para o sucesso do tratamento de infecções (HAMOUD *et al.*, 2012) ou o tempo necessário para exercer um efeito conservante eficaz em produtos alimentícios ou cosméticos.

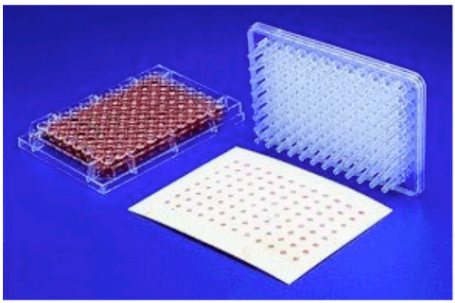
O ensaio de curva de morte microbiana é um método refinado e preciso para os estudos de mecanismo de ação de substâncias antimicrobianas (ALBANO *et al.*, 2016). A curva de morte é normalmente executada com a determinação de células viáveis, sendo um método dispendioso quanto à demanda de materiais necessários para o plaqueamento das diluições requeridas, para alcançar valores seguros nas contagens de colônias.

Diante do elevado custo e mão de obra intensa para executar diversas diluições e plaqueamentos em curtos intervalos de tempo, buscou-se uma alternativa para obter a informação do tempo necessário que um óleo essencial, em diferentes concentrações, requer para causar a morte bacteriana.

Como protocolo para determinar a CBM em diferentes tempos de interação dos óleos essenciais com as bactérias alvo, estabeleceu-se as etapas de repique das microplacas nos tempos de 3, 6, 9 e 24 horas de incubação, antes da adição da resazurina para a leitura da CIM.

Para o repique das microplacas é utilizado um replicador de 96 poços estéril (Scienceware® - Figura 5A), com volume de 10 *µL* de cada poço. O replicador é utilizado como um “carimbador” em placas de Petri (150 mm) contendo Ágar Mueller Hinton (MHA). As placas de MHA são então incubadas em condições de aerobiose a 37 °C por 24 horas, para a observação de crescimento bacteriano e determinação da CBM. O não surgimento de colônias indica a morte bacteriana (Figura 5B).





A B*

Figura 5 – (A) Leitura da Concentração Bactericida Mínima (CBM) de um óleo essencial, com o repique da microplaca realizado 24 horas após a incubação. (B) Imagem do replicador. *Fonte: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/z370819?lang=pt&region=BR. Acesso em: 17 set. 2020.

O replicador utilizado é autoclavável e permite o repique de todos os poços em um único movimento. Na Tabela 3 encontram-se os valores de CBM para três diferentes óleos essenciais em cada intervalo de tempo de incubação das microplacas.

Óleo essencial	**CBM (μL mL^{-1}) *Escherichia coli* (25922)**				**CBM (μL mL^{-1}) *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosembach (ATCC 29213)**			
	3h	**6h**	**9h**	**24h**	**3h**	**6h**	**9h**	**24h**
1	>25,6	6,4	3,2	3,2	12,8	12,8	12,8	12,8
2	12,8	12,8	6,4	3,2	6,4	6,4	3,2	3,2
3	>25,6	>25,6	25,6	12,8	12,8	12,8	12,8	12,8

Tabela 3 – Concentrações Bactericidas Mínimas (CBM) em μL.mL^{-1} dos óleos essenciais em cada intervalo de tempo de incubação, contra *Escherichia coli* (25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213).

Foi possível observar que nas primeiras três horas de contato com as células de *Staphylococcus aureus* subsp*. aureus* Rosembach (Gram positiva) já houve a ação efetiva dos óleos essenciais de (1) e (3) na CBM final (12,8 μL mL^{-1}). Para o óleo essencial (2) foram necessárias nove horas de contato para a ação da CBM final (12,8 μL mL^{-1}). Já para a bactéria Gram negativa *Escherichia coli* a ação efetiva da CBM dos óleos essenciais (2) e (3) foi alcançada com somente 24 horas de incubação, provavelmente por terem uma ação mais lenta dos óleos essenciais em efetivamente matar as bactérias Gram negativas, pela possibilidade de interação dos compostos químicos dos óleos essenciais com os lipopolissacarídeos da membrana externa, retardando o alcance dos mesmos na membrana celular, principal alvo de ação dos componentes dos óleos essenciais.

5 I MÉTODOS DE DIFUSÃO EM ÁGAR

Muitas pesquisas científicas com óleos essenciais são publicadas apresentando resultados de CIM a partir de estudos que utilizaram as técnicas de difusão em ágar, principalmente o método de difusão em disco. O halo de inibição formado é medido no final do período de incubação.

Esse método pode utilizar o papel de filtro estéril, cilindros de aço colocado no meio de cultura ou orifícios perfurados no meio de cultura. Para extratos aquosos é possível considerar que irá ocorrer a difusão dos compostos ativos, pois os mesmos são solúveis no meio de cultura (preparado como uma solução aquosa). No entanto, o método torna-se inapropriado para amostras não polares ou que não se difundem facilmente no ágar. De modo geral, a potência antimicrobiana de amostras ainda em prospecção nem sempre pode ser comparada com os antibióticos convencionais, principalmente por causa das diferenças e desconhecidas propriedades físicas, como solubilidade, volatilidade e difusão em ágar (COS *et al.*, 2006).

6 I CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método de microdiluição em placas é o mais indicado para a pesquisa de atividade antimicrobiana de óleos essenciais, por ser de baixo custo em relação ao material necessário e a quantidade de amostra. A leitura do método de microdiluição utilizando o indicador resazurina facilita o desenvolvimento de estudos com antimicrobianos naturais, como os óleos essenciais, justamente por não necessitar de instrumentação como ocorre na leitura por turbidez. No entanto, a subjetividade na leitura dos diversos tons entre o azul e o rosa pode ser um fator limitante, quando não há parâmetros de coloração para antimicrobianos ainda não estabelecidos. Dessa forma, a utilização de um tratamento de imagem, favorecido pela utilização da resazurina, que se reduz a um composto fluorescente para os resultados positivos, permite aplicar ferramentas como o software ImageJ ou o fotodocumentador, proporcionando maior segurança e confiabilidade nos resultados a serem gerados com o método da microdiluição em placas.

Com o auxílio de um replicador é possível obter de forma prática e acessível o repique de todos os poços da microplaca utilizada para determinar a CIM, obtendo-se também a leitura da CBM ou CFM. O estudo do tempo de morte microbiano, em que repiques da microplaca são realizados ao longo do tempo de incubação, ainda pode fornecer informações importantes para a cinética de morte microbiana.

REFERÊNCIAS

ALBANO, M.; ALVES, F. C. B.; ANDRADE, B. F. M. T. BARBOSA, L. N. PEREIRA, A. F. M. CUNHA, M. L. R. S. RALL, V. L. M. FERNANDES JÚNIOR, A. Antibacterial and anti-staphylococcal enterotoxin activities of phenolic compounds. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 38, part A, p. 83-90, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 64, de 11 de dezembro de 2018. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/55217765/do1-2018-12-14-portaria-n-64-de-11-de-dezembro-de-2018-55217696. Acesso em: 05 mar. 2021.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE / NATIONAL COMITEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (CSLI/NCCLS). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Wayne: CLSI/NCCLS document M7-A8, 2009.

COS, P.; VLIETINCK, A. J.; BERGHE, D. V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 290–302, 2006.

ERB, R. E.; EHLERS, M. H. Resazurin reducing time as an indicator of bovine semen capacity. **Journal of Dairy Science**, v. 33, n. 12, p. 853-864, 1950.

HAMOUD, R.; SPORER, F.; REICHLING, J.; WINK, M. Antimicrobial activity of a traditionally used complex essential oil distillate (Olbas® Tropfen) in comparison to its individual essential oil ingredientes. **Phytomedicine**, v. 19, p. 969–976, 2012.

MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibintory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, n. 4, p. 538-544, 1998.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Europen Journal of Biochemestry**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M. GUERRA, J. SWINGS, J. PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720–2722, 2002.

SOBRE A ORGANIZADORA

DANIELA REIS JOAQUIM DE FREITAS - Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2000), com mestrado em Biologia Celular e Molecular (2002), doutorado em Ciências (2006) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Durante o mestrado e o doutorado trabalhou diretamente com biologia celular e molecular e bioquímica, na clonagem e expressão de genes do carrapato *Rhipicephalus (boophilus) microplus*. Também trabalhou com morte celular e estresse oxidativo no carrapato. Fez Pós-doutorado na área de Ciências Médicas - Farmacologia (2007) na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Ainda em 2007 trabalhou como professora substituta na Disciplina de Laboratório Clínico para Biomedicina e na disciplina de Imunologia para os cursos de Nutrição, Biomedicina e Medicina na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, até 2009. Após, trabalhou na Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) – *Campus* Chapecó (2010 a 2013) e na Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC) (2010 a 2014), para os cursos de Zootecnia, Agronomia, Ciências Biológicas, Psicologia, Engenharia Florestal, ministrando disciplinas como: Parasitologia, Zoologia, Microbiologia, Imunologia, Farmacologia entre outras. Atualmente é professora Adjunta III e líder do Grupo de Estudos em Microbiologia e Parasitologia (NUEMP) no Departamento de Parasitologia e Microbiologia, e membro do Núcleo de Pesquisa em Prevenção e Controle de Infecções em Serviços de Saúde (NUPCISS) na Universidade Federal do Piauí. Também é docente permanente do Programa de Pós-Graduação em Enfermagem - PPGEnf-UFPI. Tem experiência nas áreas de Biologia Celular e Molecular, Imunologia, Parasitologia, Microbiologia e Farmacologia Experimental e tem linhas de pesquisa em Controle de Infecções em Serviços de Saúde, Infecções comunitárias e Educação em Saúde.

ÍNDICE REMISSIVO

A

Amazônia 174, 229, 230, 231, 232, 240, 242

Análise de água potável 194

Antimicrobianos naturais 255, 256, 257, 266

Artérias carótidas 17, 18, 22, 27, 35, 36, 37, 38

Automedicação 1, 2, 3, 4, 5, 7, 15, 16

Avaliação histopatológica 49

Avifauna 134, 135, 138, 141, 142, 143, 146

B

Baccharis milleflora 79, 80, 82, 85, 86, 90, 92

Bolor preto do pão 147, 149, 150

Bursaphelenchus cocophilus 43, 45, 46, 48

C

Cajanus cajan L. 163, 164, 167, 170

Células vivas 99, 245, 246

Cicatrização de pele 49

Clonagem de DNA 245, 246, 247, 248, 249, 250, 252, 253

Cultivo celular 94, 95, 105

D

Difusão em ágar 256, 266

Distância genética 43, 44, 45, 46

DNA genômico 175, 177, 179, 180, 181, 182, 247

Docentes 155, 156, 160, 162

E

Echinococose cística (*Echinococcosis quística*) 108, 109, 183, 184, 187, 190

Educação superior 155, 161

Estações ecológicas 134, 143

Extrato de nódulos 163, 168, 171, 173, 174

F

Fator de virulência 79, 80

Feijão guandu 163, 167, 168, 169, 171, 172, 173

Fungos oportunistas 79

G

Gestação 62, 63, 65, 73, 75, 78

H

Hospedeiros intermediários (*Hospederos intermediarios*) 108, 110, 111, 123, 132

M

Medicamentos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 11, 12, 50, 52, 60, 61, 63, 88, 215, 230, 231, 239, 241

Melanomas 214, 215, 216, 218, 228

Microdiluição 79, 83, 84, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 266

O

Odontologia 155, 156, 157, 158, 160, 161, 162

Óleos essenciais 79, 81, 87, 89, 92, 93, 229, 231, 232, 233, 234, 236, 240, 241, 242, 243, 244, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266

P

Parâmetros fisícos-químicos 194

Parâmetros microbiológicos 196

Pereskia aculeata Miller 49, 50, 51, 59, 60, 61

Physalis L. 175, 176, 179, 180, 181

Projeto de extensão 203, 204, 206, 211, 212

Proteção integral 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 143, 144

R

Ratos Wistar 49

Reprogramações metabólicas 214

Rhizopus stolonifer 147, 149, 152, 153

T

Testes de sensibilidade antimicrobiana 255

Tratamento médico (tratamiento médico) 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193

V

Vacina recombinante (vacuna recombinante) 108, 113, 114, 115, 116, 118, 122, 123, 125, 126, 127, 131, 132

O Fortalecimento Intensivo das Ciências Biológicas e suas Interfaces 2

www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br
@atenaeditora
www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Atena Editora
Ano 2021

O Fortalecimento Intensivo das Ciências Biológicas e suas Interfaces 2

www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br
@atenaeditora
www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Atena Editora
Ano 2021